

Travail des Laboratoires de Chimie biologique et médicale
de la Faculté de Médecine de Montpellier
Professeur P. CRISTOL

A propos du dosage des polypeptides sériques

**Recherches
sur la composition
du " double azote "**

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
de Montpellier

le 17 juillet 1939

par

JEAN FOURCADE

né le 28 mars 1908 à Montpellier

DOCTEUR EN PHARMACIE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

DIPLÔMÉ D'ÉTUDES PÉNALES

ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

(PRIX SWIECICKI, 1934)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**EXAMINATEURS
DE LA THÈSE**

MM. CRISTOL, Prof., *Président.*

LISBONNE, Prof.

PUECH, Prof.

CANALS, Prof. Fac. de Phar.)

Assesseurs.

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA CHARITÉ
(PIERRE-ROUGE)

1939

**Recherches sur la composition
du “ double azote ”**

Travail des Laboratoires de Chimie biologique et médicale
de la Faculté de Médecine de Montpellier
Professeur P. CRISTOL

A propos du dosage des polypeptides sériques

**Recherches
sur la composition
du “ double azote ”**

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
de Montpellier

le 17 juillet 1939

par

JEAN FOURCADE

né le 28 mars 1908 à Montpellier

DOCTEUR EN PHARMACIE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

DIPLOMÉ D'ÉTUDES PÉNALES

ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

(PRIX SWIECICKI, 1934)

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

EXAMINATEURS
DE LA THÈSE

MM. CRISTOL, Prof., *Président.*
LISBONNE, Prof.
PUECH, Prof.
CANALS, Prof. Fac. de Phar.)

Assesseurs.

MONTPELLIER

IMPRIMERIE DE LA CHARITE

(PIERRE-ROUGE)

1939

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs

Anatomie	MM. J. DELMAS
Histologie	TURCHINI,
Physiologie	L. HÉDON
Chimie biologique et médicale et toxicologie.....	CRISTOL,
Physique médicale	PECH.
Anatomie pathologique	GRYNFELT.
Microbiologie.....	LISBONNE.
Pathologie et thérapeutique générales	PAGÈS.
Thérapeutique et matière médicale	JANBON.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	PUECH.
Hygiène	CARRIEU.
Médecine légale et médecine sociale	VIDAL.
Pathologie médicale et clinique propédeutique	BOULET.
Clinique médicale	GIRAUD.
	RIMBAUD.
Clinique chirurgicale.....	MASSABUAU, <i>assesseur</i>
	RICHE.
Clinique obstétricale	P. DELMAS.
Clinique des maladies mentales et nerveuses	EUZIÈRE, <i>doyen</i> .
Clinique des maladies des enfants et hygiène du premier âge.....	BOUDET.
Clinique de dermatosyphiligraphie.....	MARGAROT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ETIENNE.
Clinique des maladies des voies urinaires	JEANBRAU.
Clinique gynécologique	LAPEYRE.
Clinique ophtalmologique	DEJEAN.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	TERRACOL.
Radiologie (ch. de c.).....	LAMARQUE.
Anatomie (ch. de c.).....	LAUX.
Histologie (ch. de c.).....	GRANEL.

Honorariat

Professeurs honoraires :

MM. RODET, TÉDENAT, FORGUE, ESTOR.
BERTIN-SANS GALAVIELLE, BOSCH, VIREN, VILLARD, CABANNES

Chargés de cours complémentaires

Pathologie externe	MOURGUE-MOLINES
Médecine opératoire	ROUX, <i>agréé</i> .
Accouchements	N...
Clinique phthisiologique.....	VIDAL, <i>prof</i> .
Pathologie médicale et clinique propédeutique médicale.	BAUMEL.
Clinique propédeutique médicale.....	P. RIMBAUD
Clinique des maladies contagieuses	JANBON.
Stomatologie.....	D ^r FERRIER
Histoire naturelle médicale	Dr HARANT.
Chirurgie expérimentale	GUIBAL.

Agrégés en exercice

Médecine.....	MM. BAUMEL,	Chirurgie.....	MM. AIMES.
	P. RIMBAUD		MOURGUE-MOLINES.
	LAFON, <i>ch. d'agr.</i>		GUIBAL.
	BOUCOMONT, <i>ch. d'agr.</i>		ROUX.
		Chimie.....	MONNIER, <i>ch. d'agr.</i>
		Bactériologie.....	CARRÈRE.
		Ophtalmologie.....	DEJEAN.
		Obstétrique	CADÉRAS DE KERLEAU
			<i>ch. d'agr.</i>

Examineurs de la thèse

MM. CRISTOL, Prof., *Prés.* | MM. PUECH, Prof.
LISBONNE, Prof. | CANALS, Prof. *Fac. de Phar.*

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CRISTOL

Professeur de Chimie biologique médicale et de Toxicologie
à la Faculté de Médecine de Montpellier,

*En témoignage de ma vive gratitude
et de mon profond attachement.*



A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. LISBONNE

Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Médecine de Montpellier,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. PUECH

Professeur d'Hydrologie thérapeutique et de Climatologie
à la Faculté de Médecine de Montpellier,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. CANALS

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

A TOUS MES MAÎTRES

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

Depuis dix à quinze ans, les polypeptides — c'est-à-dire, dans l'acception la plus large du terme, les composés azotés non protéïdiques donnant deux ou plusieurs acides aminés à l'hydrolyse — ont pris une grande importance en physiopathologie.

Parmi les méthodes de dosage des polypeptides sériques, l'une des premières en date et des plus couramment employées est la méthode indirecte de CRISTOL (CRISTOL et PUECH [1]), basée sur l'inégalité du pouvoir précipitant des divers désalbuminants vis-à-vis des composés azotés du sérum sanguin.

Dans cette méthode, le dosage des polypeptides consiste essentiellement :

1^o à débarrasser une portion du sérum étudié de ses seuls protéïdes par une désalbumination restreinte ;

2^o à débarrasser l'autre portion du sérum de l'ensemble de ses protéïdes et de ses polypeptides, sans toucher aux autres composés azotés, par une désalbumination d'action plus étendue ;

3^o enfin, à doser l'azote total des filtrats en rapportant les résultats au litre de sérum ; la différence entre les valeurs obtenues représente, exprimés par leur azote, les polypeptides correspondants.

La différence ainsi définie a été dénommée par CRISTOL (CRISTOL et PUECH [1]) : *indice de polypeptidémie* ; on la désigne encore par : *double azote* — expression due à WOLFF [2] —

quand on ne veut pas préjuger de la nature de l'azote auquel elle est due.

Pour que l'indice de polypeptidémie représente effectivement l'azote polypeptidique, il faut et il suffit que les désalbuminations précédentes assurent exactement les évictions prévues et que les dosages d'azote soient précis.

CRISTOL utilise, comme désalbumination restreinte, la désalbumination trichloracétique de MOOG [3], et comme désalbumination étendue, une désalbumination lutéophosphotungstique au cinquième (1) ; d'après ses vérifications, ces désalbuminations permettraient d'atteindre le but envisagé. Quant aux dosages d'azote, il les effectue suivant la méthode classique de PREGL [4] dont la précision est pratiquement satisfaisante.

Les possibilités des modes de désalbumination adoptés par CRISTOL ont été controversées.

Pour RAPPAPORT [5], la nature polypeptidique des substances responsables du double azote ne serait pas démontrée. Pour ACHARD, LEVY et MARYNOWSKY [6], la désalbumination restreinte provoquerait une hydrolyse partielle des protéides et, de ce fait, le taux d'azote des filtrats correspondants serait artificiellement élevé. D'après GOIFFON et SPAEY (GOIFFON et SPAEY [7], GOIFFON [8]) et d'après LOISELEUR [9], le précipité trichloracétique retiendrait, dans certains cas, une partie des polypeptides sériques. Enfin selon MARTENS [10, 11], le double azote comprendrait plus d'acides diaminés que de polypeptides.

Quoiqu'il en soit, le recours à la méthode de CRISTOL s'est révélé fort profitable en clinique et de nombreux travaux (PUECH et CRISTOL [12, 13], PUECH [14, 15, 16, 17], HENRIET [18], CRISTOL et PUECH [19], CAZALS [20], etc.) ont mis, notamment, en évidence la valeur pronostique de l'indice de polypeptidémie.

Devant l'intérêt clinique du double azote défini par la méthode de CRISTOL, nous nous sommes proposé d'en préciser la composition réelle et, par là, la signification physiopathologique. Nous exposerons ici les recherches ainsi entreprises.

(1) Nous désignerons ultérieurement cette désalbumination par : *désalbumination de CRISTOL*.

LIMITES ET PLAN DU TRAVAIL

Pour préciser la composition du *double azote*, nous avons d'abord recherché à quelles substances il devait son existence ; à cet effet, nous avons étudié le pouvoir précipitant des acides trichloracétique et lutéophosphotungstique sur les composés azotés en solution aqueuse, puis sur ces mêmes composés en solution dans du sérum.

Nous nous sommes ensuite efforcé d'établir dans quelle mesure les diverses substances responsables de cet azote — essentiellement, les polypeptides à base d'acides diaminés et tous ceux de haute condensation — contribuaient à son obtention ; nous y sommes parvenu en étudiant, d'une part, l'action de la permutite (1) sur les composés azotés du sang et sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL (2), d'autre part, la teneur de ces filtrats en *azote peptidique* (3).

Avant de rapporter ces recherches et les conclusions auxquelles nous nous sommes arrêté, nous exposerons les justifications et les principales critiques dont la méthode de CRISTOL a fait l'objet ; nous traiterons ensuite des méthodes que nous avons utilisées pour effectuer nos divers dosages (dosages d'azote total et d'azote peptidique), puis de la question — parfois controversée — de l'expression des résultats obtenus avec un filtrat de désalbumination par rapport au sérum initial ; enfin, nous décrirons et justifierons le mode de désalbumination trichloracétique au cinquième que l'on peut substituer à la désalbumination de MOOG pour simplifier le calcul précis du double azote et qui nous a permis de mener à bien un point du présent travail.

(1) Silicate double d'aluminium et de sodium hydraté.

(2) Nous désignerons ainsi les filtrats de désalbumination du sérum sanguin suivant les techniques de MOOG et de CRISTOL.

(3) Nous désignerons ainsi l'azote des liaisons -CO-NH- des polypeptides.

En résumé, nous diviserons notre exposé de la façon suivante :

PREMIÈRE PARTIE

ASPECT DE LA QUESTION ET CONDITIONS GÉNÉRALES DE NOTRE ÉTUDE

CHAPITRE PREMIER : La méthode de dosage des polypeptides sériques de CRISTOL.

CHAPITRE II : Méthodes de dosage utilisées dans nos recherches.

CHAPITRE III : Expression des résultats par rapport au sérum dans les dosages comportant une désalbumination préalable.

CHAPITRE IV : Substitution d'une désalbumination trichloracétique au cinquième à la désalbumination de MOOG dans le dosage du double azote.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA COMPOSITION DU « DOUBLE AZOTE »

CHAPITRE PREMIER : Action de l'acide trichloracétique et de l'acide lutéophosphotungstique sur les composés azotés du sang en solution aqueuse.

CHAPITRE II : Action de l'acide trichloracétique et de l'acide lutéophosphotungstique sur les composés azotés du sang en solution dans du sérum.

CHAPITRE III : Action de la permutite sur les composés azotés du sang et sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL.

CHAPITRE IV : Azote peptidique des filtrats de MOOG et de CRISTOL et composition du double azote.

PREMIÈRE PARTIE

Aspect de la question
et conditions générales de notre étude

CHAPITRE PREMIER

LA MÉTHODE DE DOSAGE DES POLYPEPTIDES SÉRIQUES DE CRISTOL

§ 1. — Technique de la méthode.

Dans ses points essentiels, la technique de la méthode de CRISTOL est la suivante (CRISTOL [21]) :

1° Désalbumination restreinte.

C'est la désalbumination classique de MOOG [3] :

On traite un volume du sérum étudié par un égal volume de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ; on mélange avec soin en évitant toute formation de grumeaux et l'on sépare par filtration ou par vive centrifugation (centrifugation d'au moins 5 minutes à 6.000 tours) le précipité formé.

2° Désalbumination étendue (désalbumination de CRISTOL).

On mélange dans l'ordre, en agitant constamment :

Sérum sanguin	$n \text{ cm}^3$
Solution de lutéophosphotungstate de Na (P_2O_5 , 18WO_3 , $3\text{ONa}_2 + 22\text{H}_2\text{O}$) (1) à 10 p. 100	$n \text{ cm}^3$
Eau distillée	$2n \text{ cm}^3$
Acide sulfurique 2N/3	$n \text{ cm}^3$

(1) Pour le mode de préparation et les caractères de ce sel, se reporter à l'appendice, p. 129.

Après homogénéisation, on sépare le précipité par filtration ou par vive centrifugation.

3^o Dosage de l'azote total des filtrats.

La méthode suivie est celle de PREGI [4], application à l'échelle microanalytique de la méthode générale de KJELDHAL [22] :

On traite un volume convenable de filtrat — deux ou cinq cm³, dans le cas d'un sang normal, selon qu'il s'agit d'une désalbumination au demi ou au cinquième — par un cm³ d'acide sulfurique concentré et pur, on déplace l'ammoniaque du liquide de destruction par la soude au moyen de l'appareil de PARNAS et WAGNER [23], enfin on dose alcalimétriquement cette ammoniaque par titrage en retour ; les résultats obtenus, exprimés en azote, sont rapportés au litre de sérum.

§ 2. — Justifications de la méthode de Cristol.

CRISTOL a proposé sa méthode de dosage des polypeptides sériques au cours d'importantes études sur la désalbumination du sérum sanguin (CRISTOL [24, 25, 26, 27, 28, 21], CRISTOL et SIMONNET [29], CRISTOL et PORTES [30], CRISTOL et BOUKOVALA [31], CRISTOL et NIKOLITCH [32, 33], CRISTOL et PUECH [1, 34], CRISTOL et TRIVAS [35]. D'après les résultats de diverses expériences, il admet que la désalbumination de MOOG et la désalbumination phosphotungstique qu'il préconise sont bien appropriées au dosage par différence de l'azote des polypeptides sériques.

Les résultats invoqués sont les suivants :

a) Si l'on défèque, volume à volume, un même sérum par des solutions d'acide trichloracétique de concentration croissante, le filtrat relatif à la solution trichloracétique à 20 p. 100 est pratiquement le moins riche en azote.

Quand la concentration de la solution trichloracétique descend à moins de 20 p. 100, l'augmentation de l'azote total des filtrats est due à l'insuffisance des désalbuminations ; les réactions des protéïdes (réaction du biuret, réaction de TANRET, etc...) sont en effet constamment positives avec ces filtrats, alors qu'elles ne le sont qu'exceptionnellement avec les filtrats à 20 p. 100.

Quand la concentration de la solution trichloracétique dépasse 20 ou 30 p. 100, l'augmentation de l'azote total des filtrats tient à un début d'hydrolyse des protéïdes par le défécant hyperacide.

b) Lorsque les réactions des protéïdes sont positives avec un filtrat de MOOG, ces réactions sont aussi positives avec la solution obtenue par dialyse aseptique du sérum étudié ; quand ces réactions sont, par contre, négatives avec le filtrat de MOOG, elles le sont également avec le dialysat.

c) Traitée, volume à volume, par une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100, une solution de peptone — solution riche en polypeptides — ne précipite que très légèrement et les réactions du biuret et de TANRET sont positives avec le filtrat correspondant, ce qui indique le passage des polypeptides.

Dans le cas d'un liquide de digestion pancréatique de caséïne pour lequel la dégradation hydrolytique a été poussée très loin, l'addition d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ne détermine aucun précipité ; les réactions du biuret et de TANRET sont néanmoins fortement positives avec le mélange par suite de sa haute teneur en polypeptides.

d) Le taux d'azote des filtrats de MOOG ne dépend pas, au moins pour des temps compris entre 15 minutes et 24 heures, de la durée du contact de la solution trichloracétique et du sérum.

e) Si l'on défèque un même sérum par l'acide lutéophosphotungstique, selon la technique de CRISTOL, en utilisant des solutions sulfuriques de diverses concentrations, le filtrat obtenu avec l'acide sulfurique 2N/3 est pratiquement le moins riche en azote.

Dans le cas de solutions sulfuriques de titre inférieur à $2N/3$, la plus forte teneur en azote des filtrats provient d'un défaut de précipitation des grosses molécules ; dans le cas inverse, elle provient d'un début d'hydrolyse des protéides.

f) Comparée à la désalbumination de MOOG et aux désalbuminations tungstique, molybdique et phosphomolybdique *optima*, la désalbumination de CRISTOL est celle dont le pouvoir déféquant est le plus étendu ; la désalbumination de MOOG a, par contre, le pouvoir déféquant le plus faible.

g) Les réactions des protéides sont toujours négatives avec les filtrats phosphotungstiques de CRISTOL ; elles le sont pareillement quand les désalbuminations portent, non plus sur un sérum mais sur une solution de peptone ou sur un liquide de digestion pancréatique de caséine. Ces dernières désalbuminations sont constamment marquées par une précipitation assez abondante.

h) Quelle que soit l'acidité réalisée, les filtrats trichloracétiques, tungstiques, phosphotungstiques, molybdiques et phosphomolybdiques d'un même sérum sanguin conduisent à des résultats identiques dans le dosage de l'urée, de la créatinine et des acides aminés ; si l'on ajoute, par ailleurs, de la créatine au sérum déféqué, cette créatine est retrouvée quantitativement dans les filtrats ; enfin, aucun coagulum ne paraît fixer l'indoxyle. On peut donc admettre que les désalbuminations précitées laissent entièrement passer les cristalloïdes azotés (1) du sang.

Dans le cas d'une solution de peptone de caséine renfermant plus d'un gramme par litre d'azote aminé, tout cet azote est encore retrouvé dans le filtrat de MOOG, mais les filtrats phosphotungstiques n'en possèdent plus que 67 à 78 p. 100 ; l'aminacidémie variant normalement de 0,07 g à 0,10 g par litre, exprimée en azote aminé, et s'élevant exceptionnellement à plus de 0,30 g (STADIE et VAN SLYKE [36]), une telle rétention partielle n'est pas à craindre avec les sérums.

(1) En entendant par là : les composés azotés non protéidiques à l'exclusion des polypeptides.

Les recherches de divers auteurs confirment plusieurs résultats précédents. Ainsi, GRIGAUT et ZIZINE [37] ont constaté que dans la désalbumination trichloracétique, les filtrats les moins riches en azote sont ceux obtenus avec les solutions d'acide trichloracétique de concentration comprise entre 20 et 30 p. 100 ; HALLIBURTON [38], STARLING [39], MARTIN [40], HILLER et VAN SLYKE [41], etc..., ont reconnu le passage des polypeptides dans les filtrats trichloracétiques ; enfin, FOLIN et WU [42], FOLIN et BERGLUND [43], MINICH [44], etc..., étudiant comparativement les filtrats trichloracétiques et les filtrats phosphomolybdiques, tungstiques ou phosphotungstiques, ont noté la plus forte teneur en azote des premiers.

Selon CRISTOL, les résultats que nous avons rappelés peuvent être interprétés comme suit :

1^o Cas de la désalbumination de MOOG :

La désalbumination de MOOG est la plus complète des désalbuminations trichloracétiques au demi (expérience *a*) ;

— elle réalise l'éviction totale des protéides (expérience *b*), mais laisse entièrement passer les polypeptides (expériences *b*, *c*, *f*) et les cristalloïdes azotés (expérience *h*) ;

— enfin, elle ne provoque aucune hydrolyse intempestive des protéides (expériences *a*, *b*, *d*).

Cette interprétation s'accorde avec l'opinion des nombreux biochimistes qui ont préconisé l'emploi de la désalbumination de MOOG dans le dosage, soit de l'azote total non protéidique, soit de divers cristalloïdes azotés du sérum sanguin (NIKOLITCH [45], LAUDAT [46], etc...).

2^o Cas de la désalbumination de CRISTOL :

La désalbumination de CRISTOL est la plus complète des désalbuminations lutéophosphotungstiques au cinquième (expérience *e*) ;

— elle assure par excellence l'éviction des protéides (expériences *f*, *g*) et des polypeptides (expérience *g*), mais laisse entièrement passer les cristalloïdes azotés (expérience *h*) ;

— enfin, elle ne provoque aucune hydrolyse des protéides (expériences *e*, *f*, *g*).

En résumé, la désalbumination de MOOG et la désalbumination de CRISTOL, présenteraient les caractères voulus pour permettre le dosage indirect des polypeptides sériques et la méthode proposée se trouverait justifiée.

CRISTOL, s'est attaché à confirmer les arguments précédents par différentes preuves.

Preuve qualitative.

Si l'on injecte une solution de peptone à un chien ou à un lapin, les filtrats de MOOG obtenus avec le sang de l'animal donnent bientôt les réactions des peptones — notamment, la réaction du biuret et la réaction de TANRET — alors que ces réactions étaient négatives avant l'injection. Par contre, la peptone injectée n'est jamais décelée dans les filtrats de CRISTOL (CRISTOL et NIKOLITCH [32]).

Preuve quantitative.

Soit une solution de peptone de caséine « Roche » contenant 14,4 g d'azote par litre (solution à 96,25 de peptone par litre) et dont la teneur en polypeptides, déterminée selon la méthode de CRISTOL, présente la valeur suivante :

* N total trichloracétique	4,60 g	par litre
N total phosphotungstique ..	2,26 g	» »
N polypeptidique (différence)	2,34 g	par litre

Soit d'autre part un sérum sanguin pour lequel on a :

N total trichloracétique	0,379 g	par litre
N total phosphotungstique ..	0,354 g	» »
Indice de polypeptidémie	0,025 g	par litre

On additionne quelques centimètres cubes du sérum d'un même volume de dilution au dixième de la solution de peptone, puis l'on mesure l'indice de polypeptidémie du mélange. En comparant les résultats obtenus aux résultats théoriques, on voit que les chiffres sont pratiquement concordants (CRISTOL [21]) :

	Résultats trouvés <i>en g par litre</i>	Résultats théoriques <i>en g par litre</i>	Erreur relative
N total trichloracétique.	0,416	0,419	— 0,2
N total phospho- tungstique	0,296	0,290	+ 2
Indice de polypepti- démie	0,122	0,129	— 5,4

D'après CRISTOL, les expériences ci-dessus — expériences dont FIESSINGER, OLIVIER et HERBAIN [47] ont retrouvé les résultats — achèveraient de justifier sa méthode de dosage des polypeptides sériques.

*
* *

Pour préciser tout à fait le caractère de la méthode de CRISTOL, rappelons que grâce à elle, cet auteur ne prétend pas atteindre de façon absolue le vaste ensemble des polypeptides, mais qu'il la considère seulement comme un instrument avant tout *pratique* (CRISTOL [48]) pour « étudier quantitativement les produits de dégradation intermédiaires entre les *protéines* (1) et les acides aminés » qui peuvent se trouver dans le sérum sanguin (CRISTOL [27, p. 94]). Aussi bien, si l'on considère que le terme de polypeptide désigne indifféremment des composés tels que la glycylglycine, si voisine des acides aminés, et que les albumoses, dont certaines sont si proches des véritables protéides, on conçoit qu'il serait assez vain d'espérer atteindre l'intégralité des polypeptides, et rien que les polypeptides, au moyen d'une pareille méthode.

(1) On dit maintenant *protéides*.

Rappelons enfin que la méthode de CRISTOL a été uniquement conçue en vue de doser les polypeptides dans le sang et qu'on ne saurait valablement l'utiliser pour doser ces composés dans un milieu de digestion naturelle ou artificielle (CRISTOL [21]).

§ 3. — Critiques adressées à la méthode de Cristol.

Les critiques dont la méthode de CRISTOL a fait l'objet concernent uniquement les possibilités des modes de désalbumination définissant le double azote.

I. — Critique d'Achard, Lévy et Marynowski.

ACHARD, LÉVY et MARYNOWSKI [6] ont dosé l'azote non protéique de nombreux sérums en opérant comparativement sur les filtrats de MOOG et sur les ultrafiltrats préparés selon la technique de LÉVY et PACU (LÉVY et PACU [49], PACU [50]). Ils ont ainsi constaté que les résultats obtenus à partir des filtrats de MOOG étaient constamment supérieurs à ceux obtenus à partir des ultrafiltrats correspondants.

Inversement, dans le dosage de l'urée ou de l'acide urique sériques, la désalbumination de MOOG et l'ultrafiltration conduisent à des résultats identiques.

Pour expliquer ces constatations, ACHARD, LÉVY et MARYNOWSKI admettent que la désalbumination de MOOG s'accompagne d'une hydrolyse partielle des protéides due à l'acide trichloracétique. D'après les chiffres rapportés, cette hydrolyse intempestive se traduirait par une augmentation artificielle de l'azote total non protéique atteignant 4,6 à 21,5 p. 100 pour les sérums normaux et 7,6 à 30,2 p. 100 pour certains sérums pathologiques.

II. — Critique de Goiffon et Spaey.

GOIFFON et SPAEY [51, 7] ont proposé une méthode de dosage des polypeptides sériques faisant appel, comme celle de CRISTOL, à une double désalbumination. Pour assurer la précipitation restreinte, GOIFFON et SPAEY, suivis par MONDON et AUDIFFREN [52], préfèrent recourir à une désalbumination au dixième par l'acide trichloracétique à 30 p. 1000 plutôt qu'à celle de MOOG ; ils obtiennent ainsi pour la polypeptidémie, exprimée en tyrosine, des valeurs dépassant de 0 à 70 mg par litre celles auxquelles conduit la désalbumination de MOOG. Les filtrats trichloracétiques de GOIFFON et SPAEY renferment donc plus de noyaux tyrosine que les filtrats de MOOG correspondants.

Pour GOIFFON et SPAEY (GOIFFON et SPAEY [7], GOIFFON [8]), l'inégale richesse en tyrosine de leurs filtrats et de ceux de MOOG indique que « des peptones de poids moléculaire assez élevé » sont adsorbées par les « magmas trichloracétiques concentrés » relatifs à la désalbumination de MOOG, alors qu'elles passent dans les filtrats trichloracétiques au dixième.

III. — Critique de Loiseleur.

D'après LOISELEUR [9], quand le sang contient des polypeptides — et en particulier, au cours des états s'accompagnant de phénomènes d'histolyse — une partie notable de ces polypeptides serait adsorbée par les protéides plasmatiques et suivrait leur sort au cours des désalbuminations. Dans la méthode de CRISTOL, la désalbumination de MOOG retiendrait ainsi une partie des polypeptides qui, de ce fait, échapperait aux dosages.

LOISELEUR a pensé qu'on pouvait éviter cette dernière rétention en faisant précéder la désalbumination de MOOG d'un traitement de désorption convenable et il a préconisé, comme laissant intégralement passer les polypeptides sériques, le mode opératoire suivant :

« Additionner $m \text{ cm}^3$ du sérum étudié de $m \text{ cm}^3$ d'une solution de sulfate de magnésium pur 1,5 N. Mélanger et abandonner pendant 30 minutes à la température du laboratoire (20°); ajouter ensuite au mélange $2 m \text{ cm}^3$ d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100; agiter soigneusement et séparer par centrifugation le précipité formé. »

A partir des filtrats au quart obtenus, LOISELEUR trouve effectivement pour l'azote non protéique des valeurs généralement supérieures à celles données par les filtrats de MOOG correspondants. Les différences observées, auxquelles il donne le nom d'*azote histolytique*, atteignent 15 mg par litre pour les sérums normaux et jusqu'à 163 mg par litre dans les états d'histolyse. Ainsi, la rétention de polypeptides par la désalbumination de MOOG, négligeable pour les sérums normaux, deviendrait très importante dans certains états pathologiques.

IV. — Critiques de Martens.

MARTENS a étudié en détail les possibilités de la désalbumination de MOOG et surtout, de la désalbumination phosphotungstique (MARTENS [53, 11]). Il en a conclu que la méthode de CRISTOL ne pouvait permettre le dosage correct des polypeptides sériques et il lui a préféré une méthode basée sur le dosage colorimétrique selon FOLIN [54], avant et après hydrolyse, de l'azote aminé du sérum (MARTENS [53, 55]).

MARTENS oppose aux justifications de CRISTOL les faits suivants :

a) Expérimentalement, la désalbumination de MOOG retient environ un tiers des « protoprotéoses » et des « hétéroprotéoses » (protéoses de la première fraction de ZUNZ [56]) et un sixième des « synprotéoses » (protéoses de la deuxième fraction).

b) Dans certains cas pathologiques et précisément, dans ceux où la polypeptidémie est élevée, les filtrats trichloracétiques et phosphotungstiques n'ont pas la même teneur en azote aminé comme la méthode du *double azote* le postule.

c) En dehors des polypeptides, l'acide phosphotungstique précipite divers acides aminés tels la lysine, l'arginine, l'histidine et la proline.

Après addition de ces acides aminés à des sérums, la détermination du taux de l'azote non protéique dans les filtrats phosphotungstiques indique qu'une proportion parfois très importante de lysine, d'arginine et d'histidine est précipitée par l'acide phosphotungstique, même quand le taux de l'azote aminé ajouté est de loin inférieur à un gramme par litre de sérum. Ainsi, après une addition de l-histidine correspondant à 90,3 mg d'azote total par litre, cette base est précipitée dans la proportion de 11,4 p. 100 ; pour une addition de d-arginine correspondant à 29,8 mg d'azote, la précipitation est de 53 p. 100 ; enfin, pour une addition de chlorhydrate de lysine correspondant à 38,37 mg d'azote, la précipitation atteint 85 p. 100.

d) Lorsqu'on soumet à la désalbumination phosphotungstique un filtrat de MOOG dont les polypeptides ont été décomposés par hydrolyse acide, on obtient, après un séjour de 24 heures à la glacière, une précipitation relativement importante de composés azotés non protéidiques ; cette précipitation montre que les filtrats de MOOG contiennent des substances de nature non polypeptidique que la désalbumination phosphotungstique retient.

e) L'analyse de filtrats phosphotungstiques provenant de sérums auxquels on a ajouté certains dipeptides, comme la glycyl-glycine et la leucyl-glycine, ou certains tripeptides, comme la leucyl-glycyl-glycine et le glutathion, établit que chacun de ces composés échappe à la précipitation phosphotungstique dans une proportion comprise entre 78,8 p. 100 et 97,7 p. 100.

f) Le dosage de l'azote aminé d'un filtrat phosphotungstique avant et après hydrolyse met en évidence une libération d'azote aminé ; les filtrats phosphotungstiques renferment donc des polypeptides.

En définitive, selon MARTENS, le *double azote* ne correspondrait que pour une faible part à des polypeptides et il proviendrait surtout d'acides diamminés et peut-être de diamines.

* * *

Dans nos recherches, plutôt que de reprendre les critiques précédentes et de nous borner à les préciser, nous avons préféré étudier systématiquement la portée des désalbuminations définissant le double azote. Il nous paraît toutefois indispensable de revenir quelque peu sur ces critiques.

Remarques sur la critique d'ACHARD, LÉVY et MARYNOWSKI.

On conçoit combien la critique d'ACHARD, LÉVY et MARYNOWSKI, si elle était justifiée, enlèverait d'intérêt à l'indice de polypeptidémie ; si la désalbumination de Moog déterminait vraiment l'hydrolyse de certains protéides, les résultats donnés par la méthode du double azote seraient en effet, comme l'observe très justement TERROINE [57, p. 113], « à peu près dénués de toute signification ».

En réalité, les justifications de CRISTOL (voir § 2) démontrent par avance l'inexactitude des conclusions d'ACHARD, LÉVY et MARINOWSKI et nous avons tout lieu de croire que les différences constatées par ces auteurs résultent simplement de l'insuffisante perméabilité de leurs membranes d'ultrafiltration pour les polypeptides de haut poids moléculaire. A l'appui de cette hypothèse, il est d'ailleurs à noter que les ultrafiltrats de RICHTER, QUITTNER et HOENLINGER [58] sont aussi riches en azote que les filtrats trichloracétiques correspondants et que les ultrafiltrats de WILEWSKI [59] possèdent encore plus d'azote que tous les précédents.

La possibilité d'une augmentation artificielle de l'azote total non protéidique ne nous semble donc pas à retenir à propos de la désalbumination de MOOG.

Remarques sur la critique de GOIFFON et SPAEY.

Etudiant comparativement la valeur de diverses désalbuminations trichloracétiques, CRISTOL et MONNIER [60, 61] ont confirmé les résultats de GOIFFON et SPAEY concernant l'inégalité du pouvoir précipitant de la désalbumination de MOOG et de la désalbumination au dixième par l'acide trichloracétique à 30 p. 1000 ; d'après leurs chiffres, l'azote total non protéidique des filtrats de GOIFFON et SPAEY dépasserait celui des filtrats de MOOG de 0,6 à 36,1 p. 100.

D'un examen attentif des faits, CRISTOL et MONNIER concluent que l'inégale richesse en azote des uns et des autres filtrats découle, non d'une rétention de peptones par les coagulums compacts relatifs aux désalbuminations au demi, mais de l'insuffisance des précipitations assurées par les désalbuminations au dixième ; ils concluent de plus que cette insuffisance tient à la trop faible acidité des mélanges de désalbumination de GOIFFON et SPAEY (mélange à 2,7 p. 100, seulement, d'acide, contre 10 p. 100 pour les mélanges de désalbumination de MOOG).

Nous avons personnellement constaté (voir 1^{re} partie, ch. IV) que la désalbumination trichloracétique au cinquième suivante :

Sérum sanguin	2n cm ³
Eau distillée	3n cm ³
Solution d'acide trichloracétique à 20. / 100 /	5n cm ³

était exactement équivalente à la désalbumination de MOOG, ce qui confirme entièrement les conclusions de CRISTOL et MONNIER. En fait, nous montrerons ultérieurement (2^e partie, ch. II) que si les précipités relatifs à la désalbumination de MOOG ne sont pas totalement dénués de pouvoir adsorbant, les proportions de peptone qu'ils retiennent demeurent du moins inférieures à 15 p. 100.

Remarques sur la critique de LOISELEUR.

Les mélanges de désalbumination de LOISELEUR ayant la même acidité que ceux de MOOG, l'existence de l'azote histolytique ne saurait être considérée comme résultant de précipitations incomplètes. Il reste toutefois à démontrer que l'addition d'une solution de sulfate de magnésium à un plasma sanguin a bien la valeur d'un traitement de désorption des polypeptides éventuellement fixés sur les protéides, et non celle d'une dénaturation de ces protéides susceptible d'en modifier le comportement.

Quoi qu'il en soit, nous verrons dans la deuxième partie de ce travail (ch. II) que les pourcentages de polypeptides fixés par les protéides sanguins ne dépassent qu'exceptionnellement 6 p. 100 ; les expériences de vérification auxquelles nous nous sommes livré concernant l'azote histolytique nous ont d'ailleurs donné des résultats très contradictoires.

Remarques sur les critiques de MARTENS.

Des critiques de MARTENS, la deuxième (*b*) n'est pas justifiée ; si la désalbumination de MOOG et la désalbumination de CRISTOL assurent les évictions voulues, la teneur en azote aminé des filtrats trichloracétiques doit, en effet, en raison des groupements aminés libres que possèdent normalement les polypeptides, dépasser celle des filtrats phosphotungstiques correspondants.

Les autres faits rapportés paraissent bien, par contre, en désaccord avec les justifications de CRISTOL. En réalité, nous nous sommes rendu compte que l'acide phosphotungstique dont il était question pour MARTENS était, non l'acide lutéophosphotungstique — acide mis en œuvre par CRISTOL — mais l'acide phosphoduo-décitungstique, composé quelque peu différent (1) ; ces deux acides n'ayant pas le même pouvoir précipitant, les critiques de MARTENS relatives à la désalbumination phosphotungstique ne peuvent donc être prises en considération pour juger de la portée de la désalbumination de CRISTOL.

(1) Voir appendice p. 129.

CHAPITRE II

MÉTHODES DE DOSAGE UTILISÉES DANS NOS RECHERCHES

§ 1. — Dosage de l'azote total.

Nos recherches sur la composition du double azote nous ont amené à doser l'azote total de diverses solutions expérimentales et d'un grand nombre de filtrats trichloracétiques et phosphotungstiques. A cet effet, nous nous sommes adressé à la méthode de PREGL [4], déjà suivie par CRISTOL (voir p. 16).

Nous ne rappellerons pas ici les possibilités et les divers points d'une méthode désormais classique ; nous exposerons seulement les modifications d'ordre pratique que nous avons apportées à la technique primitive de PREGL au cours de dosages journaliers.

I. — Préparation des solutions titrées.

Le dosage de l'azote total selon la méthode de PREGL met en œuvre deux solutions titrées : une solution N/70 d'acide chlorhydrique et une solution de soude de même titre ; ces solutions sont directement pourvues de l'indicateur coloré adopté, le *rouge de méthyle* ou acide p. diméthylaminoazobenzène o. car-

bonique. On recueille généralement les distillats d'ammoniaque dans *cinq centimètres cubes* de la solution chlorhydrique ; dans ces conditions, les prises soumises à l'analyse doivent au plus renfermer *un milligramme d'azote total*, quantité correspondant aux cinq centimètres cubes d'acide chlorhydrique N/70 mis en jeu.

Pour préparer les solutions ci-dessus, PREGL introduit 28,6 cm³ de solution décimale d'acide chlorhydrique ou de soude dans une fiole jaugée de 200 cm³, il additionne d'une à deux gouttes de solution décimale de soude saturée de rouge de méthyle, complète jusqu'au trait avec de l'eau distillée et agite ; il obtient ainsi une solution rouge rosé dans le cas de l'acide chlorhydrique et une solution jaune serin dans le cas de la soude.

Ce mode opératoire et le recours au seul rouge de méthyle comme indicateur nous paraissent présenter trois inconvénients :

1^o La mesure de 28,6 cm³ de solution mère pour chaque 200 cm³ de solution N/70 désirés est une opération peu pratique.

2^o Lorsque la solution sodique de rouge de méthyle n'est pas exactement saturée, son emploi est à l'origine d'une certaine inexactitude dans le titre des solutions N/70.

3^o La gradation insensible par laquelle se fait, du rouge rosé au jaune serin — ou plus exactement, à un jaune restant teinté de rose — le virage du rouge de méthyle rend la fin des dosages difficile à saisir. Ce dernier inconvénient a été bien mis en lumière par NICLOUX [62, 63] qui le tourne en terminant les dosages à froid.

Pour obvier aux inconvénients précédents, nous avons apporté à la technique de PREGL des modifications appropriées :

1^o Nous partons de solutions mères N/7, permettant des mesures aisées à la pipette.

2^o Nous utilisons le rouge de méthyle à l'état de solution saturée dans l'éthanol à 95° vérifié neutre.

3° Enfin, à la manière de TASHIRO [64] et de POLONOVSKI et BOULANGER [65], nous adjoignons au rouge de méthyle une proportion convenable de bleu de méthylène (chlorhydrate de tétraméthylthionine) ; nos solutions N/70 sont ainsi, l'une violette (ClH), l'autre verte (HONa), et au moment des virages, la couleur passe du violet au vert par l'intermédiaire de diverses teintes dont une seule est franchement grise ; en nous basant sur cette teinte grise, qu'un excès de 0,01 cm³ de soude N/70 (1) suffit à faire nettement virer, nos lectures sont dès lors très exactes.

En définitive, nous préparons les solutions titrées de la façon suivante :

a) Acide chlorhydrique N/70.

Dans une fiole jaugée de 200 cm³, nous versons :

Acide chlorhydrique N/7	20 cm ³
Solution alcoolique saturée de rouge de méthyle	environ 2 cm ³
Solution aqueuse de bleu de méthylène à 0,25 p. 1000	environ 2 cm ³

Nous complétons ensuite jusqu'au trait avec de l'eau distillée bouillie et refroidie et agitons.

b) Soude N/70.

Nous opérons comme ci-dessus en remplaçant les 20 cm³ d'acide chlorhydrique N/7 par 20 cm³ de soude N/7.

Conservées dans des flacons en *pyrex* bien bouchés, les solutions obtenues sont utilisables pendant plus de quinze jours.

(1) Volume des gouttes que doit approximativement livrer la microburette utilisée.

II. — Destruction.

A) APPAREILLAGE.

PREGL effectue les destructions dans des ballons d'environ 30 cm³ de capacité, à fond rond et à col étroit et long ; ces ballons, dits *micro-kjeldhals*, constituent l'appareillage de destruction classique et nous y recourons nous-même.

Dans l'intention d'empêcher toute perte par projections, cer-



FIG. 1.

tains analystes complètent cet appareillage par des boules pédiculées (ou plus simplement, par de petits entonnoirs) dont ils coiffent les ballons dès que l'eau des prises d'essai à détruire est évaporée.

Nous avons souvent constaté que cette technique ne donnait qu'une apparente sécurité. En effet, lorsqu'une destruction s'accompagne de projections, la boule reste imprégnée d'une partie du liquide qu'elle reçoit ; on commet alors une erreur par défaut si l'on omet de récupérer ce liquide par un lavage. Quand les projections sont nombreuses, il peut même arriver qu'une partie du liquide arrêté par la boule s'égoutte à l'extérieur, ce qui fausse définitivement le dosage.

Pour éviter les erreurs précédentes, nous préférons laisser l'embouchure des ballons entièrement libre et reprendre les destructions qui ont donné lieu à des projections.

Nous rendons, par ailleurs, cette éventualité exceptionnelle en opérant dans des ballons d'un modèle approprié. Ces ballons, construits en *pyrex* d'après nos données (1), sont en quelque sorte (fig. 1) des *micro-kjeldhals* dont on a coudé le col « en baïonnette » et dont l'embouchure est pourvue en *b* (fig.) d'un bec d'écoulement ; grâce à la forme particulière du col, toute particule projetée est normalement arrêtée et les destructions les plus violentes se font sans qu'intervienne la moindre perte.

Quoi qu'il en soit, pour procéder aux destructions, nous disposons les ballons devant une feuille de papier blanc fixée verticalement ; nous sommes ainsi averti des projections qui peuvent encore survenir par les taches noires qu'elles développent sur le papier.

B) MODE OPÉRATOIRE.

Nous effectuons les destructions de la façon suivante :

En présence de 0,02 g à 0,03 g d'un catalyseur approprié (voir ci-après), nous traitons, à chaud, une prise d'essai convenable du milieu étudié (prise correspondant à moins d'un milligramme d'azote) par un centimètre cube d'acide sulfurique pur de densité : 1,83. Après décoloration, nous additionnons — à la manière de PREGL [4] — le liquide obtenu de deux gouttes d'éthanol à 95° exempt d'ammoniaque ; enfin, après nouvelle décoloration, nous laissons refroidir, étendons de quelques centimètres cubes d'eau et passons à la distillation.

Avec ce mode opératoire, nous avons constamment obtenu, pour un catalyseur et un milieu donné, le chiffre d'azote total le plus élevé ; il serait donc superflu de prolonger le chauffage

(1) Ballons construits par les ateliers Legal'ais, 18, rue Rambaud à Montpellier.

après la deuxième coloration. Par ailleurs, étant donnée la minime proportion de mélange adjuvant employée, nous n'avons pas à redouter les pertes d'azote que peut entraîner, comme BOIVIN l'a signalé [66], la présence d'un excès de catalyseur dans des milieux soumis à la minéralisation.

C) MÉLANGE CATALYSEUR.

PREGL [4] catalyse les destructions sulfuriques au moyen d'une petite quantité de sulfate de cuivre cristallisé et d'autant de sulfate de potassium, ce dernier composé étant plus spécialement destiné à élever la température d'ébullition du milieu. D'après BOIVIN [66], les destructions ainsi réalisées seraient toujours insuffisantes et l'oxalate de potassium, conseillé par DENIGÈS (DENIGÈS, CHELLE et LABAT [67]), ou le mélange de SÖRENSEN et ANDERSEN [68] (oxyde mercurique, sulfate de cuivre cristallisé et sulfate de potassium, à parties égales), donneraient de meilleurs résultats.

Bien d'autres catalyseurs ont été préconisés en vue du dosage de l'azote selon KJELDHAL (1) ; parmi les plus récents on peut citer :

— le catalyseur de LAURO [69] :

Se	1 partie,
SO ₄ K ₂	49 parties ;

— le catalyseur de BEET et FURZEY [70] :

Se	1 partie,
SO ₄ Hg	5 parties,
SO ₄ K ₂	32 parties ;

— le catalyseur de SCHWOEGLER, BABLER et HURD [71] :

SeO ₃ Cu, 2H ₂ O	1 partie,
SO ₄ K ₂	30 parties ;

(1) Voir à ce sujet PARISELLE [72].

— enfin, le catalyseur de DUMAZERT et MARCELET [73, 74, etc] :

SeO_3Hg 1 partie,

SO_4KH 24 parties.

Ces quatre mélanges — et notamment celui de DUMAZERT et MARCELET — permettraient des destructions particulièrement complètes et rapides, propriété qu'ils devraient essentiellement au sélénium (LAURO [69], MILBAUER [75]).

Avant d'adopter un catalyseur déterminé, nous avons recherché — afin d'éclairer notre choix — quelle était la valeur relative d'un certain nombre de mélanges adjuvants typiques ; à cet effet, nous avons dosé l'azote total de divers milieux en mettant en œuvre chacun de ces mélanges et nous avons comparé les taux d'azote trouvés ainsi que les temps de destruction (temps nécessaires aux doubles décolorations).

Mélanges expérimentés. — Nous avons expérimenté les mélanges suivants :

a) le mélange de PREGL :

SO_4Cu , $5\text{H}_2\text{O}$ 1 partie,

SO_4K_2 1 partie ;

b) le mélange de SCHWÖGLER, BABLER et HURD (voir p. 34) :

c) le mélange :

SeO_3Cu , $2\text{H}_2\text{O}$ 1 partie,

$\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$ 30 parties ;

d) enfin, le mélange :

SeO_4Cu , $5\text{H}_2\text{O}$ 1 partie,

SO_4K_2 30 parties.

Nous n'avons pas expérimenté de catalyseur à base de dérivés mercuriels en raison des erreurs que le mercure peut provoquer lors de la distillation ; sauf précaution convenable (1), cet élément est en effet susceptible de retenir une certaine proportion d'azote à l'état de combinaisons mercure-ammonium et nous avons constaté que cette proportion n'était pas toujours négligeable.

Résultats. — Nos dosages ont porté sur quelques solutions pures à un gramme d'azote par litre et sur divers filtrats et sérums sanguins ; les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

La comparaison de ces résultats permet de conclure :

1^o Que les destructions les plus complètes sont celles obtenues avec les mélanges renfermant du sélénium, et particulièrement avec notre mélange au séléniat de cuivre.

2^o Que ces mêmes mélanges assurent les destructions avec des rapidités voisines et dans des temps très inférieurs à ceux nécessités par le mélange de PREGL (15 à 45 minutes, au lieu de 30 minutes à 4 heures).

Mélange adopté. — Le catalyseur au séléniat de cuivre s'étant ainsi montré le plus actif, nous l'avons adopté pour nos dosages.

Comme tous les catalyseurs au sélénium, il donne des liquides de destruction qui, après dilution, prennent généralement une teinte rouge brique par mise en liberté de sélénium colloïdal ; ce phénomène ne gêne en rien la distillation ultérieure de l'ammoniaque.

(1) Précaution consistant en l'addition d'hyposulfite de sodium à la lessive de soude utilisée pour déplacer l'ammoniaque.

TABLEAU I

MILIEU ÉTUDIÉ	Azote total <i>en mg par litre</i>				Temps de destruction <i>en minutes</i>			
	Catalyseur mis en œuvre				Catalyseur mis en œuvre			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
d'acide urique	988	990	986	998	30	15	20	16
d'arginine	990	998	992	1.008	38	17	17	15
de tyrosine	968	984	976	982	100	35	28	30
de proline	988	984	—	990	45	16	—	22
d'histidine	978	990	996	992	80	30	30	26
de tryptophane	924	968	970	976	240	45	40	40
peptone de Witte	984	1.002	986	996	100	30	24	24
le Moog	280	292	286	292	70	18	16	15
	870	—	884	886	70	—	20	22
	1.558	1.572	1.576	1.572	90	28	22	19
	438	444	450	448	45	20	26	18
	1.932	1.968	1.954	1.976	160	35	40	30
le Cristol	264	266	—	268	40	18	—	22
	688	696	690	702	50	18	22	24
	1.392	1.426	1.422	1.432	90	35	35	30
	340	340	346	342	45	20	28	20
sanguin	11.720	12.100	11.960	12.060	80	28	26	22
	13.520	13.680	13.600	13.580	220	45	35	45
	12.060	12.340	12.420	12.420	110	40	45	40

§ 2. — Dosage de l'azote peptidique.

Pour obtenir l'azote *peptidique* (1) d'un filtrat sanguin, il suffit de déterminer sa teneur en azote aminé avant et après hydrolyse convenable ; la différence entre le second résultat et le premier — c'est-à-dire, entre l'azote *aminé total* et l'azote *aminé libre* du filtrat — représente l'azote peptidique cherché.

Au cours de nos recherches, nous avons ainsi dosé l'azote peptidique des filtrats de MOOG et de CRISTOL en vue de comparer leur richesse effective en polypeptides.

De nombreuses méthodes ont été proposées pour doser l'azote aminé ; ce sont celles de SÖRENSEN [76], de VAN SLYKE [77, 78], de HARDING et MAC LEAN [79], de FOREMAN [80], de FOLIN [54], de NADEAU et BRANCHEN [81], de POLONOVSKI [82], etc... Parmi celles qui ont été adaptées à l'étude des filtrats sanguins, la méthode colorimétrique de FOLIN nous paraît la mieux convenir au dosage de l'azote aminé libre ; elle se prête en même temps sans difficultés au dosage de l'azote aminé total ; aussi, bien qu'elle ne soit pas d'une précision parfaite, c'est à elle que nous nous sommes adressé, après MARTENS [53, 89, 90, 55], en vue de doser l'azote peptidique.

Nous ne reviendrons pas ici sur le principe de la méthode de FOLIN ; nous nous bornerons à décrire et à justifier la technique suivant laquelle nous avons réalisé le dosage particulier envisagé.

I. — Technique.

A) RÉACTIFS NÉCESSAIRES.

Les réactifs nécessaires sont :

a) une solution de phénolphtaléine dans l'éthanol à 0,25 g pour 100 cm³ ;

(1) Rappelons que par azote peptidique nous désignons l'azote des liaisons -CO-NH- des polypeptides.

- b) une solution de soude normale ;
- c) une solution à 10 p. 100 de carbonate de sodium anhydre (solution alcaline 1,89 N par rapport au rouge de méthyle) ;
- d) une solution d'acide chlorhydrique 2N ;
- e) une solution de soude décimale ;
- f) une solution à 0,7 p. 100 de carbonate de sodium anhydre ;
- g) une solution fraîche à 0,75 p. 100 de β -naphtoquinone-monosulfonate de sodium 1, 2, 4 ;
- h) une solution acéto-acétique renfermant :
- | | |
|------------------------------|---------------------|
| Acétate de sodium | 2,5 g |
| Acide acétique | 25 g |
| Eau distillée, q. s. p. | 100 cm ³ |
- i) une solution à 15 p. 100 d'hyposulfite de sodium cristallisé ($S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$) ;
- j) une solution étalon à 37,5 mg de glycine pure (1) pour 200 cm³ (solution à 35 mg d'azote aminé libre par litre). Les solutions d'acides aminés étant facilement altérables, nous renouvelons cette solution fréquemment ;
- k) enfin, de l'acide chlorhydrique pur de densité 1,19.

B) APPAREILLAGE.

L'appareillage particulier au dosage comprend :

1° Un tube à essai spécial *A* (fig. 2, p. 40), en *pyrex* de 2,2 cm de diamètre intérieur et de 26 cm de long, pourvu à sa partie inférieure, au niveau d'un rétrécissement, d'un trait de jauge donnant exactement 20 cm³ (2).

(1) Il importe de vérifier la pureté de l'échantillon de glycine utilisé, par exemple en déterminant sa teneur en azote.

(2) Tubes construits par les ateliers Legallais, 18, rue Rambaud à Montpellier.

2° Un flacon laveur *B* (fig. 3), renfermant 200 à 250 cm³ d'une solution d'acide sulfurique au centième.



FIG. 2.

3° Un régulateur de pression à mercure *R* (fig. 3), réglé à 4 cm de mercure et branché sur une trompe à eau *T*. Le flacon

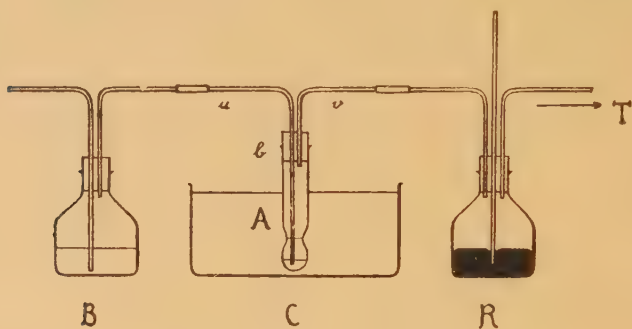


FIG. 3.

laveur et le régulateur sont reliés par deux ajutages *u* et *v*, montés sur un bouchon *b*, qui s'adapte au tube *A* ; quand le bouchon est fixé, l'extrémité inférieure de *u*, dont le diamètre utile a été réduit à environ un millimètre, atteint presque le fond du tube (fig. 3).

4° Un thermostat *C*, réglé à 30° (bain-marie électrique).

C) MODE OPÉRATOIRE.

1° Dosage de l'azote aminé libre.

Chasse de l'ammoniaque éventuelle. — Verser dans un tube *A* un volume convenable du filtrat étudié (2 ou 5 cm³ selon qu'il provient d'une désalbumination au demi ou au cinquième), neutraliser exactement par la soude normale en présence de deux gouttes de la solution de phénol-phtaléine, puis additionner de 2 cm³ de la solution de carbonate de sodium au dixième.

Introduire le tube dans le thermostat, le mettre en communication avec *B* et *R* et amorcer la trompe ; un vif courant d'air exempt d'ammoniaque vient ainsi barboter à travers la prise traitée, entraînant rapidement l'ammoniaque qu'elle peut renfermer.

Au bout d'une heure, débrancher le tube, le retirer du thermostat et récupérer le liquide dont l'ajutage plongeant *u* est resté imprégné en lavant sa partie inférieure avec 3 à 4 cm³ d'eau distillée.

Préparation de la solution colorée à comparer. — Au liquide débarrassé d'ammoniaque, ajouter peu à peu 2 cm³ d'acide chlorhydrique 2N et agiter doucement jusqu'à ce que cesse tout dégagement de gaz carbonique ; la réaction étant devenue légèrement acide, neutraliser exactement par la soude décimale, diluer jusqu'au trait (20 cm³) avec de l'eau distillée et mélanger.

Dans une fiole d'environ 50 cm³, bouchant à l'émeri, prélever 10 cm³ de la dilution (1), un centimètre cube de la solution de carbonate de sodium à 0,7 p. 100 et un centimètre cube de la solution de β -naphtoquinone-monosulfonate de sodium ; aban-

(1) Si la teneur en azote aminé libre de ces 10 cm³ s'avérait supérieure à 0,05 mg, le dosage devrait être repris sur un prélèvement de 5 cm³ porté à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

donner le tout, bouché, à l'obscurité pendant 24 heures ; introduire enfin dans la fiole un centimètre cube de la solution acéto-acétique, un centimètre cube de la solution d'hyposulfite et agiter deux à trois minutes : la solution obtenue est la solution à comparer.

Préparation de l'étalon coloré. — Dans une fiole semblable à la précédente, verser un centimètre cube de la solution étalon de glycine et 9 cm³ d'eau distillée (1) ; procéder ensuite comme pour l'inconnu.

Comparaison colorimétrique. — Comparer colorimétriquement l'inconnu à l'étalon suivant la technique habituelle. Si h et x représentent respectivement l'épaisseur donnée à l'étalon et celle trouvée pour l'inconnu, on a :

$$N \text{ aminé libre de la prise d'essai} = 0,07 \frac{h}{x} \text{ mg.}$$

Nota. — Les solutions à comparer s'altérant souvent au bout d'une à deux heures, il convient de préparer l'inconnu et l'étalon au même moment et de procéder aux lectures sans attendre.

Contrôle du départ de l'ammoniaque. — Avant de faire état du résultat d'un dosage, il est bon de s'assurer que la chasse de l'ammoniaque a été convenablement réalisée. Pour cela, additionner le liquide restant dans le tube *A* de lessive de soude jusqu'à décoloration de la phénol-phtaléine, puis traiter ce liquide par un centimètre cube de réactif de NESSLER ; dans le cas d'un entraînement insuffisant, une coloration ou un précipité jaune apparaîtraient aussitôt.

(1) Dans le cas d'un inconnu très peu coloré, un étalon à 9,5 cm³ d'eau distillée et seulement 0,5 cm³ de la solution de glycine serait préférable.

2^o Dosage de l'azote aminé total.

Hydrolyse des liaisons peptidiques. — Verser dans un tube A un volume convenable du filtrat étudié (2 ou 5 cm³ selon qu'il provient d'une désalbumination au demi ou au cinquième),



FIG. 4.

additionner de 5 cm³ d'acide chlorhydrique et, le cas échéant, compléter à 10 cm³ avec de l'eau distillée. Adapter au tube un petit réfrigérant à reflux, ou, plus simplement, un tube à dégagement d'environ 0,6 cm de diamètre et 60 cm de long, légèrement coudé à la base (fig. 4). Porter enfin le tube au bain-marie bouillant et l'y maintenir pendant 24 heures.

Chasse de l'ammoniaque. — Par distillation sous pression réduite, évaporer le liquide d'hydrolyse aux trois-quarts afin de le débarrasser de la majeure partie de l'acide chlorhydrique ; neutraliser l'acide restant par la soude normale en présence de deux gouttes de la solution de phénol-phtaléine, puis ajouter un excès de soude de 4 cm³.

Cela fait, introduire le tube dans le thermostat, le relier au flacon laveur et au régulateur de pression (voir fig. 3, p. 40) et mettre la trompe en marche.

Après une heure de barbotage, débrancher le tube, le retirer du thermostat et laver la partie inférieure de l'ajutage *u* avec 3 à 4 cm³ d'eau distillée afin d'éviter toute perte de liquide.

Préparation de la solution colorée à comparer. — Additionner le liquide débarrassé d'ammoniaque d'acide chlorhydrique 2 N jusqu'à décoloration de la phénol-phtaléine ; neutraliser exactement avec la soude décimale, étendre au volume marqué (20 cm³) avec de l'eau distillée et mélanger.

Si l'hydrolyse a donné une liqueur quelque peu colorée, traiter la dilution par 8 à 10 cg de charbon de peuplier vérifié exempt d'ammoniaque (1) et centrifuger.

Poursuivre enfin le dosage sur 10 cm³ de liquide comme dans le cas de l'azote aminé libre.

Si *j* et *y* représentent respectivement l'épaisseur donnée à l'étalon et celle trouvée pour l'inconnu, on a ici :

$$\text{N aminé total de la prise d'essai} = 0,07 \frac{j}{y} \text{ mg.}$$

(1) Il convient de s'assurer que l'échantillon de charbon employé n'a aucun pouvoir adsorbant pour les acides aminés,

II. — Justification de la technique suivie.

1° Dosage de l'azote aminé libre.

En dehors de diverses modifications d'ordre pratique qui se justifient d'elles-mêmes, notre technique de dosage de l'azote aminé libre des filtrats sanguins ne diffère de celle de FOLIN que par la précaution prise à l'endroit de l'ammoniaque et par l'emploi d'une plus forte proportion d'hyposulfite de sodium pour décolorer le β -naphthoquinone-sulfonate de sodium en excès.

Justification de la chasse de l'ammoniaque et du procédé de chasse adopté. — La teneur en ammoniaque du sang, négligeable au moment des prélèvements (1), devient relativement importante *in vitro* en raison de l'autolyse ; ce phénomène engendre, en effet, près de 0,07 mg d'azote ammoniacal par litre de sang et par minute, à 20° (PARNAS et HELLER [84]). Le β -naphthoquinone-sulfonate de sodium réagissant aussi bien avec l'ammoniaque qu'avec les acides aminés (FOLIN [54]), nos dosages devaient donc être précédés d'une élimination rigoureuse de l'ammoniaque ; à défaut d'une telle élimination, un écart de deux heures entre les prises de sang et les dosages aurait déjà entraîné des erreurs d'environ + 7 p. 100, ce qui montre la nécessité de l'opération.

Le procédé de chasse que nous avons adopté — procédé au carbonate de sodium — nous paraît pleinement justifié par ses propriétés :

1° Il débarrasse entièrement d'ammoniaque tout filtrat préparé moins de trois à quatre heures après la prise de sang, que le prélèvement ait, ou non, été conservé à la glacière.

(1) On sait que l'ammoniémie, exprimée en azote, n'atteint que 0,10 à 0,32 mg par litre (PARNAS [83]).

2° Il ne provoque aucune hydrolyse sensible des polypeptides ou de l'urée, donc aucune libération intempestive d'acides aminés ou de carbonate d'ammoniaque.

3° Enfin, il assure l'éviction des amines volatiles qui — comme l'ont signalé BECHER et HERMANN [85] — peuvent se trouver dans les filtrats, amines dont la présence fausserait aussi les dosages.

Justification de la proportion d'hyposulfite mise en œuvre. — L'étude expérimentale de la méthode de FOLIN nous a permis de constater que pour détruire une même quantité de β -naphthoquinone-sulfonate de sodium, on devait la traiter par une quantité d'hyposulfite d'autant plus grande que le milieu était plus tamponné ; la destruction de la quinone est ainsi moins aisée en milieu acéto-acétique qu'en milieu exclusivement acétique.

La proportion d'hyposulfite de sodium mise en œuvre dans notre technique — 20 g de $S_2O_3Na_2$, $5H_2O$ par gramme de quinone — est celle que nous avons reconnue indispensable pour assurer constamment la décoloration de l'excès de quinone. Cette proportion, deux fois et demi supérieure à celle adoptée par FOLIN [54], ne présente aucun inconvénient pour les dosages.

2° Dosage de l'azote aminé total.

Justification du mode d'hydrolyse. — L'hydrolyse des polypeptides par l'acide chlorhydrique pur et le bain-marie bouillant a été préconisée par divers auteurs (HILLER¹ et VAN SLYKE [41], MARTENS [55], etc.). Nous avons, néanmoins, vérifié la valeur de notre mode opératoire en dosant l'azote peptidique de solutions titrées de nombreux di et tri-peptides (1) et en comparant les teneurs trouvées aux teneurs théoriques ; les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau II.

(1) Produits biochimiques « ROCHE », de pureté contrôlée avant usage.

TABLÉAU II

Polypeptides étudiés	N peptidique en mg p. litre		N dosé
	Calculé	Dosé	N calculé p. 100
Glycyl-glycine	50	48,6	97,2
Glycyl-leucine	50	47,8	95,6
Glycyl-tyrosine	50	46,4	92,8
Glycyl-tryptophane	40	35,6	89,0
Alanyl-glycine	50	49,0	98,0
Leucyl-tyrosine	50	46,8	93,6
Glycyl-glycyl-glycine	80	75,4	94,25
Leucyl-glycyl-glycine	80	76,6	95,75
Glutathion	80	75,0	93,75

D'après ces résultats, on voit que nos hydrolyses ne libèrent pas moins de 89 p. 100 de l'azote peptidique, ce qui nous paraît satisfaisant. Les plus grands écarts observés entre l'azote calculé et l'azote dosé — ceux relatifs au glycyl-tryptophane, à la glycyl-tyrosine et à la leucyl-tyrosine — tiennent d'ailleurs à une transformation partielle du tryptophane ou de la tyrosine en substances humiques (1), transformation qu'aucun mode d'hydrolyse acide ne permet d'éviter entièrement (MITCHELL et HAMILTON [88]).

(1) Transformation mise en évidence par les travaux de GORTNER et BLISH [86], de ROXAS [87], etc...

Justification du procédé de chasse. — Lorsqu'on soumet un filtrat sanguin à l'hydrolyse chlorhydrique, plusieurs de ses constituants — l'urée, l'acide urique, la créatinine, etc... — engendrent de l'ammoniaque ; de ce fait, on ne peut débarrasser un filtrat hydrolysé de la totalité de son ammoniaque qu'au moyen d'un procédé de chasse énergique.

Suivant le procédé décrit, l'ammoniaque est déplacée avec une rapidité suffisante pour que son éviction soit toujours largement assurée, cependant que les groupements aminés sont intégralement respectés. En alcalinisant par la soude, nous obtenons le départ de l'ammoniaque sans difficultés ; ce départ serait plus laborieux si, à la manière de MARTENS [89, 90, 91], nous alcalinisions par le carbonate de lithium ; ce sel, peu soluble, cristalliserait en effet sur le tube adducteur lors du barbotage, restreignant ainsi le courant gazeux.

CHAPITRE III

EXPRESSION DES RÉSULTATS PAR RAPPORT AU SÉRUM DANS LES DOSAGES COMPORTANT UNE DÉSALBUMINATION PRÉALABLE

A) Calcul théorique.

Considérons une désalbumination au demi portant sur m cm³ de sérum sanguin et soient p cm³ et v cm³ les volumes respectifs du précipité et du filtrat ; on a obligatoirement la relation : $v = 2m - p$. A un centimètre cube de sérum correspond donc :

$$(2 - \frac{p}{m}) \text{ centimètres cubes de filtrat.}$$

Par suite, dans tout dosage comportant une désalbumination au demi, si C_f est la teneur du filtrat en la substance étudiée, teneur déterminée par analyse, la teneur du sérum initial en cette même substance sera, en toute rigueur :

$$C_s = (2 - \frac{p}{m}) C_f : (I).$$

Plus généralement, quand on désalbumine « au n ième » un sérum ou un liquide quelconque, chaque centimètre cube de sérum ou de liquide correspond à : $(n - \frac{p}{m})$ centimètres cubes de filtrat ; dans ces conditions, l'équation I donnant la teneur C_s devient :

$$C_s = (n - \frac{p}{m}) C_f : (II).$$

En résumé, lorsqu'un dosage est effectué sur un filtrat de désalbumination, connaissant le volume p (c'est-à-dire le volume de précipité relatif aux m cm³ de sérum traités), on obtient la valeur exacte de C_s , résultat exprimé en fonction du sérum, à partir de C_f , résultat trouvé, au moyen de l'équation II.

DÉTERMINATION DE p .

Deux procédés permettent de déterminer p :

a) *Procédé expérimental.* — La désalbumination étant réalisée dans un tube approprié, on centrifuge directement le mélange du sérum et du désalbuminant 5 minutes à 6.000 tours et l'on décante soigneusement le liquide surnageant ; on dessèche ensuite le culot jusqu'à poids constant à l'étuve à 105°, ce qui le réduit en un bouton compact ; le volume de ce bouton, mesuré par la méthode du déplacement, est le volume p cherché.

Dans le tableau III, nous avons réuni les valeurs ainsi obtenues au cours de multiples essais, rapportées à un centimètre cube de sérum.

TABLÉAU III

m é	Mode de désalbumination	cm ³ de précipité par cm ³ de sérum
n I	1 vol. sérum + 1 vol. CCl ₃ .COOH à 20 p. 100	0,064
n II	<i>id.</i>	0,066
n III	<i>id.</i>	0,064
n IV	<i>id.</i>	0,060
n I	<i>id.</i>	0,068
I	<i>id.</i>	0,066
n II	2 vol. sérum + 1 vol. OH ₂ + 3 vol. CCl ₃ .COOH à 20 p. 100	0,064
n V	<i>id.</i>	0,070
n II	<i>id.</i>	0,062
n VI	1 vol. sérum + 1 vol. OH ₂ + 2 vol. CCl ₃ .COOH à 20 p. 100	0,064
n VI	2 vol. sérum + 3 vol. OH ₂ + 5 vol. CCl ₃ .COOH à 20 p. 100	0,064
VII	<i>id.</i>	0,070
II	<i>id.</i>	0,062
V	1 vol. sérum + 4 vol. CCl ₃ . COOH à 12,5 p. 100	0,066
I	1 vol. sérum + 1 vol. phosphotungstate Na + 2 vol. OH ₂ + 1 vol. SO ₄ H ₂ 2N/3	0,066
II	<i>id.</i>	0,072
III	<i>id.</i>	0,064
I	<i>id.</i>	0,068
I	<i>id.</i>	0,072

D'après ces résultats, on voit que les volumes $\bar{p}$ sont toujours voisins de 0,066 *m* cm³ (volume moyen).

b) *Procédé de KAHANE*. — Selon KAHANE [91], étant donné la teneur du sérum sanguin en protéides — environ 80 p. 1000 — et la densité de ceux-ci — environ 1,25 — on peut admettre que le volume du précipité engendré par m centimètres cubes d'un sérum quelconque est : $p = \frac{80}{1,25} m = 0,064 m$, ce qui concorde pleinement avec les résultats expérimentaux précédents.

En définitive, quels que soient, pratiquement, le désalbuminant, le mode de désalbumination et le sérum mis en œuvre, le volume p peut être considéré, avec une approximation satisfaisante, comme égal à $0,065 m \text{ cm}^3$; en remplaçant p par cette valeur dans l'équation II, on obtient alors :

$$C_s = (n - 0,065) C_f : \text{(III)},$$

relation qui donne directement C_s à partir de C_f .

B) Calcul simplifié.

Pour simplifier le calcul de C_s , on se borne souvent, en clinique, à se baser sur le volume apparent des filtrats. Ainsi, dans les désalbuminations au demi, on procède comme si un volume de sérum correspondait à deux volumes de filtrat, autrement dit, on applique la formule : $C_s = 2C_f$; plus généralement, dans une désalbumination « au n ième » on admet que :

$$C_s = n C_f : \text{(IV)}.$$

Le calcul de C_s au moyen de ces formules pratiques comporte un certain degré d'inexactitude; les valeurs trouvées dépassent en effet de $0,065 C_f$ celles auxquelles conduit l'équation exacte III. Dans le tableau IV nous avons indiqué les erreurs relatives résultant théoriquement de cette différence.

TABLEAU IV

albumination	Erreur relative théorique pour 100 :	
	$E. R. = \frac{n C_f - (n - 0,065) C_f}{(n - 0,065) C_f} \times 100 = \frac{0,065}{n - 0,065} \times 100$	
demie		+ 3,25
tiers		+ 2,17
quart		+ 1,62
cinquième		+ 1,30
sixième		+ 1,08
septième		+ 0,93
...		...
dixième		+ 0,65
...		...

Ces erreurs théoriques se confondent entièrement avec les chiffres expérimentaux de KAHANE [91] et avec ceux que nous avons nous-même obtenus. Signalons, à ce sujet, notre désaccord avec MEZINCESKO [92] qui assigne un taux de + 10 à + 14 pour 100 à l'erreur concernant la désalbumination au demi de MOOG ; plus justement, MOOG écrit que si le volume du précipité résultant de sa désalbumination « semble important quand on l'observe dans la liqueur où le précipité s'est formé, il est en réalité fort minime » (MOOG [3]), et que l'erreur commise lorsqu'on le néglige reste, de ce fait, inférieure à 4 p. 100 (MOOG [93]).

D'après ce qui précède, le calcul simplifié des teneurs C_s nous paraît pleinement justifié à partir des désalbuminations au cinquième, les erreurs devenant alors négligeables. Avec les désalbuminations au demi, au tiers et au quart, ce calcul nous semble encore suffisant pour les dosages courants ; par contre, dans un travail tel que celui-ci où les résultats doivent être très précis, il est indispensable — notamment avec les désalbuminations au demi — de recourir à l'équation IV.

CAS PARTICULIER DU DOSAGE DU DOUBLE AZOTE.

Considérons un sérum sanguin quelconque et soient : N_t , son azote trichloracétique de MOOG, N_1 son azote phosphotungstique de CRISTOL, et P son indice de polypeptidémie ; on a la relation :

$$P = N_t - N_1 : (V).$$

Supposons que N_t et N_1 aient été calculés d'après l'équation IV (voir p. 52) ; ces valeurs comportent dès lors une erreur systématique, la première de + 3,25 p. 100, la seconde de + 1,3 p. 100 ; dans ces conditions, l'indice de polypeptidémie est lui-même entaché d'une erreur par excès dont le taux, en raison des valeurs relatives de N_t et de N_1 , peut être supérieur à 15 p. 100. Si l'azote trichloracétique était seul établi d'après l'équation IV, l'azote phosphotungstique étant calculé exactement, l'erreur sur P , cette fois par défaut, pourrait encore dépasser 10 p. 100.

Etant donné l'importance des erreurs précédentes, il convient, sinon en clinique, du moins dans les recherches expérimentales, de les éviter. Lorsqu'on dose les polypeptides sériques suivant la méthode de CRISTOL, on doit donc — comme nous l'avons toujours fait dans ce travail — évaluer N_t et N_1 d'après l'équation exacte III (voir p. 52), c'est-à-dire appliquer la formule :

$$P = 1,935 \times N \text{ du filtrat de MOOG} - 4,935 \times N \text{ du filtrat phosphotungstique} : (VI).$$

CHAPITRE IV

SUBSTITUTION D'UNE DÉSALBUMINATION TRICHLORACÉTIQUE AU CINQUIÈME A LA DÉSALBUMINATION DE MOOG DANS LE DOSAGE DU DOUBLE AZOTE

Si la désalbumination de Moog était une désalbumination au cinquième, l'indice de polypeptidémie pourrait être obtenu avec une précision satisfaisante au moyen d'une relation plus simple que l'équation VI (voir p. 54) ; en calculant N_t et N_1 d'après l'équation IV (voir p. 52), on aurait, en effet, à $\pm 1,3$ p. 100 près :

$$P = N_t - N_1 = 5 (N \text{ du filtrat trichloracétique} - N \text{ du filtrat phosphotungstique}) : (\text{VII}).$$

Nous nous sommes proposé de rendre cette dernière formule applicable en substituant à la désalbumination restreinte de CRISTOL une désalbumination trichloracétique au cinquième équivalente ; dans cette intention, nous avons étudié comparativement — par des dosages d'azote total non protéidique — la valeur de la désalbumination de MOOG et de diverses désalbuminations trichloracétiques au cinquième pour trouver une désalbumination au cinquième appropriée.

Modes de désalbumination expérimentés.

L'étude critique de la désalbumination trichloracétique a permis à CRISTOL et MONNIER [60] d'établir ce fait intéressant : quelle que soit la dilution réalisée par la désalbumination, la valeur de l'azote total trichloracétique d'un sérum ne dépend que de « la concentration finale de l'acide trichloracétique dans le mélange : *sérum + acide* ».

Tenant compte de cette indication, nous nous sommes borné à expérimenter deux modes de désalbumination au cinquième conduisant à des mélanges identiques à ceux que donne la désalbumination de MOOG (modes A et B) et deux modes voisins (modes C et D). Nous avons résumé la technique et les caractéristiques de ces quatre modes ainsi que de celui de MOOG dans le tableau V ; précisons que nous avons toujours introduit, dans l'ordre, l'eau — éventuellement — et la solution trichloracétique dans le sérum, en agitant soigneusement après chaque addition.

TABLEAU V

Mode de désalbumination	Volumes respectifs de sérum, d'eau distillée et de solution trichloracétique utilisés			Teneur en acide de la solution trichloracétique en g p. 100 cm ³	Concentration de l'acide dans mélange de précipitation en g p. 100 cm ³
	Sérum	Eau	Solut. trichl.		
Moog	2	0	2	20	10
A	2	3	5	20	10
B	2	0	8	12,5	10
C	2	0	8	15	12
D	2	3	5	15	7,5

Résultats.

Pour permettre une exacte comparaison de la désalbumination de MOOG et des désalbuminations au cinquième envisagées, nous avons établi tous les résultats de l'expérimentation précédente d'après l'équation III (voir p. 52) ; ces résultats sont rapportés dans le tableau VI.

TABLÉAU VI

Sérum étudié	N total trichloracétique en mg par litre				
	Mode de désalbumination				
	Moog	A	B	C	D
Humain I	348	342	336	380	356
Humain II	1.566	1.548	1.598	1.592	1.626
Humain III	226	—	232	240	230
Humain IV	2.572	2.592	2.606	2.650	2.642
Humain VI	790	782	820	832	784
Humain VII	268	266	260	270	308
Mouton I	344	350	352	366	352
Mouton II	418	426	—	416	460
Cheval I	312	312	326	330	316
Cheval II	446	442	452	490	462
Cheval III	416	410	422	468	428

Comme on le voit, les taux d'azote obtenus après désalbumination de MOOG s'écartent sensiblement de ceux auxquels conduisent les modes B, C et D, les modes C et D donnant les chiffres les plus différents. Par contre, la désalbumination de

Moog et le mode A assurent constamment les défécations quasi-équivalentes : avec ces deux désalbuminations, les différences observées entre les taux d'azote correspondants restent, en effet, inférieures à 2 p. 100.

Lorsqu'on dose les polypeptides suivant la méthode de CRISTOL, on peut donc substituer le mode de désalbumination A à la désalbumination de MOOG et calculer, dès lors, le double azote d'après l'équation VII.

Dans le présent travail, désireux de ne pas nous écarter de la technique propre de CRISTOL, nous n'avons recouru au mode de désalbumination A que pour étudier le pouvoir précipitant de la désalbumination restreinte sur les composés azotés non protéidiques en solution dans du sérum (voir 2^e partie, ch. II), étude à laquelle la désalbumination de MOOG se prêtait mal. C'est, du reste, pour pouvoir procéder à cette étude que nous avons initialement recherché une désalbumination au cinquième équivalente à la désalbumination restreinte de CRISTOL ; il est, d'ailleurs, à remarquer que cette nouvelle désalbumination restreinte est parfois d'un emploi moins pratique que celui de la désalbumination de MOOG, cette dernière permettant de doser à la fois l'azote total trichloracétique et l'azotémie.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles
sur la composition du "double azote"

Parmi les composés azotés du sang, les protéïdes sont nécessairement étrangers au double azote ; les travaux de CRISTOL, établissent, en effet, en toute certitude que les désalbuminations définissant l'indice de polypeptidémie, assurent toutes deux l'éviction complète de ces composés (voir 1^{re} partie, ch. I, § 2). D'autres composés azotés, l'ammoniaque, la choline, la méthyl et la diméthyl-guanidines, les diamines, l'adrénaline, l'indoxyle, l'acide hippurique et l'allantoïne, ne se trouvent dans le sang qu'en proportions trop faibles pour pouvoir contribuer de façon appréciable à l'existence du double azote (1). Toute expérimentation sur les protéïdes ou sur ces derniers composés était donc sans intérêt dans le présent travail.

Dans nos recherches sur les composés azotés du sang (ch. I à III), nous avons, dès lors, limité notre expérimentation à l'urée, à l'acide urique, à la créatinine, à la créatine, aux acides aminés et aux polypeptides.

Nos recherches sur les acides aminés et les polypeptides ont porté sur les composés suivants :

(1) La concentration du sang en choline — celui de ces composés dont le sang renferme le plus — atteindrait en effet au maximum 7 mg par litre (PAGE et SCHMIDT, d'après THOMAS [94, p. 643]), c'est-à-dire, moins d'un milligramme d'azote par litre.

ACIDES AMINÉS

1° ACYCLIQUES.

*a) Monoamino-
monoacides*

glycine
d-alanine
d-valine
l-leucine
dl-sérine

*b) Monoamino-
diacides*

acide l-aspartique
acide d-glutamique

*c) Diamino-
monoacides*

d-ornithine
d-lysine

d) dérivé guanidique

d-arginine

e) aminoacides sulfurés

cystéine
dl-méthionine
l-cystine

2° CYCLIQUES.

d-phényl-alanine
l-tyrosine
l-proline

l-oxypoline
l-histidine
l-tryptophane

POLYPEPTIDES

a) Cyclopeptide

cyclo-glycyl-glycine

b) Dipeptides

glycyl-glycine
glycyl-l-leucine
glycyl-l-tyrosine
glycyl-l-tryptophane
dl-alanyl-glycine
d-leucyl-glycine
l-leucyl-l-tyrosine

c) Tripeptides

glycyl-glycyl-glycine
d-leucyl-glycyl-glycine
glutathion

Faute d'en posséder, nous n'avons pu expérimenter sur des polypeptides purs présentant une condensation supérieure à celle des tripeptides, ou renfermant des acides aminés tels que l'ornithine, la lysine, l'arginine ou l'histidine.

*
* *

Dans nos recherches sur les composés ci-dessus, nous avons mis chacun d'eux en œuvre à l'état de solution à un gramme d'azote total par litre ; nous avons aussi recouru à une solution d'urée à 5 g d'azote total par litre.

Nous avons préparé ces solutions mères avec des produits très purs (1) et en employant comme solvant :

a) dans le cas de l'acide urique, le carbonate de lithium à 0,5 p. 100 ;

b) dans le cas de l'acide aspartique, de la cystine, de la phényl-alanine, de la tyrosine, du tryptophane et du glycyl-tryptophane, l'acide chlorhydrique décinormal ;

c) enfin, dans tous les autres cas, simplement l'eau distillée (2)

Notons qu'à défaut d'ornithine, de lysine et de cystéine libres, nous nous sommes adressé aux chlorhydrates de ces composés.

(1) Produits biochimiques « Roche » (des laboratoires Hoffmann La Roche et Cie, 10, rue Crillon à Paris) dont nous avons contrôlé la teneur en azote.

(2) Dans le cas de la cyclo-glycyl-glycine, nous obtenons la dissolution en chauffant légèrement.

CHAPITRE PREMIER

ACTION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE ET DE L'ACIDE LUTÉOPHOSPHOTUNGSTIQUE SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS DU SANG EN SOLUTION AQUEUSE

Dans cette étude, nous nous sommes proposé de préciser quel était le pouvoir précipitant de l'acide trichloracétique et de l'acide lutéophosphotungstique sur les composés azotés non protéidiques du sang en solution aqueuse.

A cet effet, nous avons soumis à l'action de l'un et de l'autre acides des solutions de concentration croissante de chacun de ces composés, et nous avons recherché :

1^o à partir de quelles concentrations respectives ces solutions étaient précipitées par l'acide trichloracétique ;

2^o à partir de quelles concentrations elles l'étaient par l'acide lutéophosphotungstique ;

3^o enfin, quels étaient, pour les solutions de concentration supérieure à ces concentrations limites, les pourcentages de composé précipités.

Limites de notre expérimentation. — Les teneurs du sérum sanguin normal ou pathologique en composés azotés non protéïdiques restent pratiquement inférieures aux valeurs suivantes :

Composé	Teneur <i>en g N p. litre</i>
Urée	2 à 3
Acide urique	0,07 à 0,10
Créatinine	0,06 à 0,09
Créatine	0,01 à 0,02
Acides aminés totaux	0,3 à 0,4
Polypeptides totaux	0,3 à 0,4

Dans ces conditions, nous avons limité notre expérimentation aux solutions de concentration comprise (exprimée en azote) entre zéro et cinq grammes par litre dans le cas de l'urée, et entre zéro et un gramme par litre dans tous les autres cas ; étant donné l'objet de ce travail, une expérimentation plus large eût été, en effet, sans intérêt.

§ I. — Technique.

Pour obtenir des résultats qui nous renseignent utilement sur la composition du double azote, nous avons étudié l'action des acides trichloracétique et lutéophosphotungstique sur les composés azotés du sang en opérant, respectivement, dans les conditions de la désalbumination de MOOG et dans les conditions de la désalbumination de CRISTOL. Afin de préciser cette action avec exactitude, nous avons, quel que soit le composé envisagé, fait porter nos déterminations sur des solutions dont les concentrations différaient seulement (exprimées en azote) de 0,04 g par litre, solutions préparées par dilution convenable, avec de l'eau distillée, des solutions mères précédemment définies (p. 63).

Recherches complémentaires. — Diverses expériences nous ont permis de constater que le pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique pour les composés azotés du sang dépendait dans une large mesure, d'une part, de la température (CRISTOL et FOURCADE [95]), d'autre part, de la concentration en acide lutéophosphotungstique.

De ce fait, il nous a paru intéressant d'étudier l'action de l'acide lutéophosphotungstique, non seulement dans les conditions normales de la désalbumination de CRISTOL, mais encore :

a) en remplaçant la solution de lutéophosphotungstate de sodium à 10 p. 100 par une solution à 7,5, à 5, à 2,5 ou à 0,5 p. 100 et en réduisant, en conséquence, le titre de la solution sulfurique à N/2, N/3, N/6 ou N/30 ;

b) en opérant, non plus à la température habituelle du laboratoire (21°-22°), mais à celle du frigorigène (4°-5°).

Dans ces recherches complémentaires, nous nous sommes toutefois borné à établir à partir de quelles concentrations l'acide lutéophosphotungstique précipitait les composés traités.

MODE OPÉRATOIRE.

1° Étude du pouvoir précipitant de l'acide trichloracétique.

Dans un tube à centrifuger, nous introduisons 5 cm³ de solution du composé envisagé et un égal volume de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ; après mélange soigneux, nous laissons reposer dix minutes à la température du laboratoire puis notons si un précipité est apparu.

Dans l'affirmative (1), nous centrifugeons pendant cinq minutes à 5.000 tours pour rassembler le précipité et dosons l'azote resté en solution sur une partie aliquote du liquide clair ; en rapportant le résultat à la teneur en azote de la prise d'essai, nous obtenons le pourcentage de composé correspondant à cet azote, d'où nous déduisons le pourcentage précipité cherché.

(1) Nous verrons qu'elle ne se présente pas dans le cas de l'acide trichloracétique.

2° Étude du pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique.

a) A la température habituelle du laboratoire. — Dans un tube à centrifuger, nous introduisons dans l'ordre :

Solution du composé envisagé 5 cm³

Solution de lutéophosphotungstate de sodium (1) à 10 (7,5 - 5 - 2,5 ou 0,5) p. 100. 5 cm³

Eau distillée 10 cm³

Acide sulfurique 2N 3 (N/2 - N/3 - N 6 ou N/30) 5 cm³

Après homogénéisation, nous laissons reposer dix minutes à la température du laboratoire puis notons si un précipité est apparu.

Dans l'affirmative (mais seulement dans les essais effectués avec le lutéophosphotungstate de sodium à 10 p. 100), nous poursuivons enfin comme dans le cas de l'acide trichloracétique pour établir le pourcentage de composé précipité.

b) A la température du frigorigène. — Pour étudier l'action de l'acide lutéophosphotungstique à 4°-5°, nous substituons simplement un repos de vingt-quatre heures au frigorigène au repos de dix minutes, dans le mode opératoire ci-dessus.

(1) Nous donnons plus loin (voir appendice, p. 129) un mode de préparation de ce sel.

§ 2. — Résultats.

I. — Pouvoir précipitant de l'acide trichloracétique.

Dans les limites et les conditions de notre expérimentation, l'acide trichloracétique ne précipite, comme il fallait s'y attendre, aucun des composés traités.

Ces résultats s'accordent pleinement avec les conclusions de CRISTOL sur la portée de la désalbumination de MOOG (voir p. 19), conclusions suivant lesquelles cette désalbumination laisserait entièrement passer les polypeptides et les cristalloïdes azotés.

II. — Pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique.

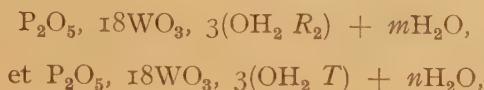
L'étude du pouvoir précipitant de l'*acide phosphotungstique* — sans autre spécification — sur les composés azotés non protéidiques du sang a fait l'objet de nombreux travaux (HAUSMANN [96], GULEWITCH [97], WETZEL [98], KUTSCHER [99], OSBORNE et HARRIS [100], VAN SLYKE [101, 102], HANKE et KOESSLER [103], GORTNER et HOFFMANN [104], PLIMMER et ROSEDALE [105], DAVIES [106], KERNOT et KNAGGS [107], BUSSIT [108], etc...). La plupart nous paraissent, toutefois, se rapporter à l'*acide phosphoduodécitungstique* (1), aussi n'en retiendrons-nous pas les résultats.

Dans les limites et les conditions de notre expérimentation, seuls, parmi les composés traités, la créatine, l'ornithine, les bases hexoniques (lysine, arginine et histidine), la cystine le tryptophane et le glycyl-tryptophane sont précipitables par l'acide lutéophosphotungstique.

La précipitation de ces divers composés résulte de leur pas-

(1) Voir appendice, p. 129.

sage à l'état de lutéophosphotungstates, peu solubles, sous l'action de l'acide lutéophosphotungstique ; ces dérivés ont vraisemblablement pour formules :



R représentant une molécule de créatinine, de tryptophane ou de glycyl-tryptophane, et *T* une molécule d'ornithine, de base hexonique ou de cystine.

A) CONCENTRATIONS DONNANT LIEU AUX PRÉCIPITATIONS INITIALES.

Nos résultats concernant les précipitations initiales sont rapportés dans le tableau VII, (p. 70).

D'après ces résultats, on voit que les concentrations donnant lieu aux précipitations initiales par l'acide lutéophosphotungstique s'élèvent avec la température et que dans les limites de notre expérimentation, seules l'ornithine, les bases hexoniques et la cystine sont précipitables dès la température ordinaire (21°-22°) ; on voit d'autre part que la solubilité des lutéophosphotungstates formés — celui de créatinine excepté — croît régulièrement avec la concentration en acide lutéophosphotungstique du milieu.

Tout cela se retrouve aisément dans les figures 5 (p. 71) et 6 (p. 72) où nous avons respectivement représenté les concentrations donnant lieu aux précipitations initiales à 21°-22° (fig. 5) et à 4°-5° (fig. 6) en fonction du titre de la solution lutéophosphotungstique employée.

TABLEAU VII

Conditions d'expérience		Concentration donnant lieu à la précipitation initiale en mg N par litre									
Température	Titre de la solution de phosphate	Créatinine	Ornithine	Lysine	Arginine	Histidine	Cystine	Tryptophane	Glycyl-tryptophane	Urée	Autres composés
21° - 22°	10 p. 100	> 1000	800	800	600	360	680	> 1000	> 1000	Non précipitable à des concentrations ≤ 5 000	Non précipitables à des concentrations ≤ 1000
<i>id.</i>	7,5 p. 100	> 1000	640	640	480	280	640	> 1000	> 1000		
<i>id.</i>	5 p. 100	> 1000	480	480	360	240	560	> 1000	> 1000	Non précipitable à des concentrations ≤ 5 000	Non précipitables à des concentrations ≤ 1000
<i>id.</i>	2,5 p. 100	> 1000	320	320	240	160	520	> 1000	> 1000		
<i>id.</i>	0,5 p. 100	> 1000	240	200	120	120	440	> 1000	> 1000	Non précipitable à des concentrations ≤ 5 000	Non précipitables à des concentrations ≤ 1000
4° - 5°	10 p. 100	> 1000 (1200)	440	440	400	240	360	> 1000	> 1000		
<i>id.</i>	7,5 p. 100	> 1000 (1120)	360	360	320	200	320	> 1000 (1080)	1000	Non précipitable à des concentrations ≤ 5 000	Non précipitables à des concentrations ≤ 1000
<i>id.</i>	5 p. 100	> 1000 (1040)	280	280	240	160	280	960	880		
<i>id.</i>	2,5 p. 100	920	200	200	160	120	240	840	720	Non précipitable à des concentrations ≤ 5 000	Non précipitables à des concentrations ≤ 1000
<i>id.</i>	0,5 p. 100	> 1000 (1040)	120	120	80	80	160	680	560		

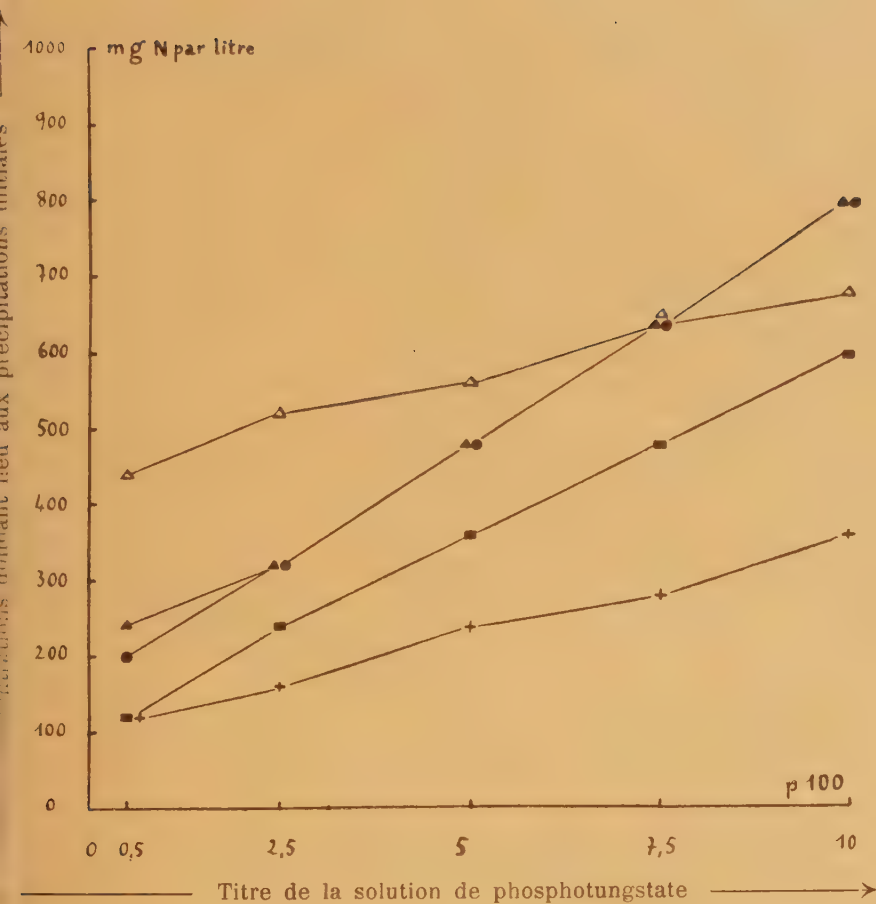


Fig. 5.

Légende.

- | | |
|-------------------|-------------------|
| ▲ ornithine (22°) | ■ arginine (21°) |
| ● lysine (22°) | + histidine (21°) |
| Δ cystine (22°) | |

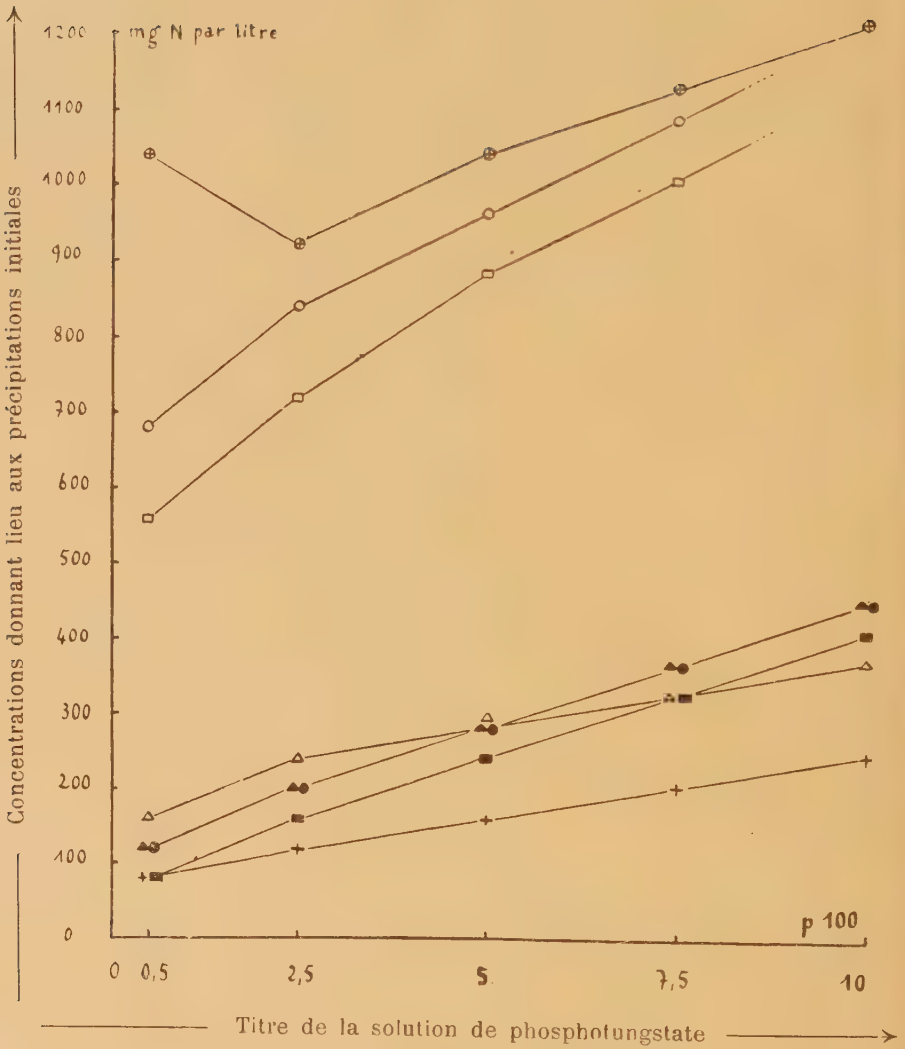


Fig. 6.

Légende.

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| ⊕ créatinine (4°) | + histidine (5°) |
| ▲ ornithine (4°) | Δ cystine (4°) |
| ● lysine (4°) | ○ tryptophane (4°) |
| ■ arginine (5°) | □ glycyl-tryptophane (4°) |

Des courbes tracées, on peut immédiatement déduire, par extrapolation, les concentrations, au moins approximatives, qui donneraient lieu aux précipitations initiales des composés correspondants en l'absence de tout excès d'acide lutéophosphotungstique. Ces concentrations sont les suivantes (tableau VIII) :

TABLEAU VIII

Composé	Concentration donnant lieu à la précipitation initiale en l'absence de tout excès d'acide lutéophosphotungstique en mg N p. litre	
	4°-5°	21°-22°
Créatinine	1.070	? (> 1.070)
Ornithine	100	220
Lysine	100	170
Arginine	60	90
Histidine	70	110
Cystine	140	420
Tryptophane	640	? (> 640)
Glycyl-tryptophane ...	520	? (> 520)

Sauf pour la créatinine, ce sont là les concentrations minima à partir desquelles ces composés peuvent être précipités par l'acide lutéophosphotungstique dans une défécation au cinquième.

En ce qui concerne les autres composés expérimentés, nous avons pu nous assurer que même en l'absence de tout excès d'acide lutéophosphotungstique, aucun d'eux n'était précipitable à des concentrations inférieures ou égales à 1.000 mg par litre (exprimées en azote), l'urée ne l'étant d'ailleurs pas à des concentrations cinq fois plus fortes.

Influence de l'acidité. — Pour compléter l'étude précédente, nous avons recherché si les modifications de l'acidité du milieu ne pouvaient, à elles seules, influencer sur le pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique.

A cet effet, nous avons déterminé les concentrations de précipitation initiale à 21°-22° de l'ornithine, des bases hexoniques et de la cystine par le lutéophosphotungstate de sodium à 2,5 p. 100 et l'acide sulfurique 2N/3. Voici quels ont été nos résultats :

Composé	Concentration donnant lieu à la précipitation initiale
	<i>en mg N p. litre</i>
Ornithine ,.....	400
Lysine	400
Arginine	280
Histidine	200
Cystine	520

Etant donné les valeurs obtenues lorsqu'on opère avec l'acide sulfurique N/6 (voir tableau VII, p. 70), ces résultats permettent de conclure que dans les limites de notre expérimentation, l'influence de l'acidité sur le pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique est pratiquement négligeable par rapport à celle de la concentration en acide lutéophosphotungstique ou à celle de la température.

B) POURCENTAGES DE COMPOSÉ PRÉCIPITÉS POUR LES CONCENTRATIONS SUPÉRIEURES AUX CONCENTRATIONS LIMITES.

Nous n'avons précisé l'étendue des précipitations que pour celles obtenues dans les conditions normales de la désalbumination de CRISTOL (phosphotungstate de sodium à 10 p. 100, température ordinaire) ; nos résultats sont réunis dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Composé étudié	Concentration de la solution traitée <i>en mg N p. litre</i>	mg N de la prise d'essai	mg N restés en solution	Composé précipité p. 100
Ornithine	800	4,0	3,95	1,2
	840	4,2	3,85	8,3
	880	4,4	3,71	15,7
	920	4,6	3,63	21,1
	1000	5,0	3,37	32,6
Lysine	800	4,0	3,98	0,5
	840	4,2	3,81	9,3
	880	4,4	3,72	15,5
	920	4,6	3,54	23,0
	1000	5,0	3,31	33,8
Arginine	600	3,0	2,97	1,0
	640	3,2	2,93	8,4
	720	3,6	2,87	20,3
	800	4,0	2,86	28,5
	880	4,4	2,78	36,8
	1000	5,0	2,69	46,2
Histidine	360	1,8	1,77	1,7
	400	2,0	1,76	12,0
	480	2,4	1,66	30,8
	560	2,8	1,64	41,4
	640	3,2	1,58	50,6
	720	3,6	1,48	58,9
	840	4,2	1,45	65,5
	1000	5,0	1,34	73,2
Cystine	680	3,4	3,36	1,2
	720	3,6	3,34	7,2
	760	3,8	3,34	12,1
	840	4,2	3,30	21,4
	920	4,6	3,24	29,6
	1000	5,0	3,18	36,4

De ces résultats, nous retiendrons seulement que la solubilité des lutéophosphotungstates d'ornithine, de bases hexoniques et de cystine, décroît constamment lorsque s'élève la concentration des solutions traitées ; cela nous paraît s'expliquer par la diminution de plus en plus marquée de la concentration en acide lutéophosphotungstique qu'entraîne la formation de ces sels en quantités croissantes.

Dans la figure 7, nous avons représenté graphiquement les quantités d'azote restées en solution en fonction de celles renfermées dans les prises d'essai ; quel que soit le composé considéré, on voit que ces quantités varient de façon sensiblement proportionnelle.

* * *

En ce qui concerne les polypeptides, les résultats précédents n'ont trait qu'à quelques di et tri-peptides, aussi convient-il de préciser davantage le pouvoir précipitant des acides trichloracétique et lutéophosphotungstique sur ces composés.

Pouvoir précipitant de l'acide trichloracétique sur les polypeptides.

Les recherches d'HALLIBURTON [38], de STARLING [39], de MARTIN [40], d'HILLER et VAN SLYKE [41], celles enfin de CRISTOL (CRISTOL et PUECH [1], CRISTOL [27]), ont montré que les peptones échappaient à peu près entièrement, au moins sous une faible concentration, à la précipitation trichloracétique. Selon HALLIBURTON (*loc. cit.*), il en serait encore de même pour les albumoses, substances essentiellement constituées, ainsi que les peptones, de polypeptides de haute condensation.

Nous pouvons donc conclure que dans les limites et les conditions de notre expérimentation, l'acide trichloracétique ne précipite aucun polypeptide, à l'exception, toutefois, comme il résulte

des indications plus rigoureuses de MARTIN [40] et de MARTENS [53], d'une fraction des « protoprotéoses », des « hétéropro-

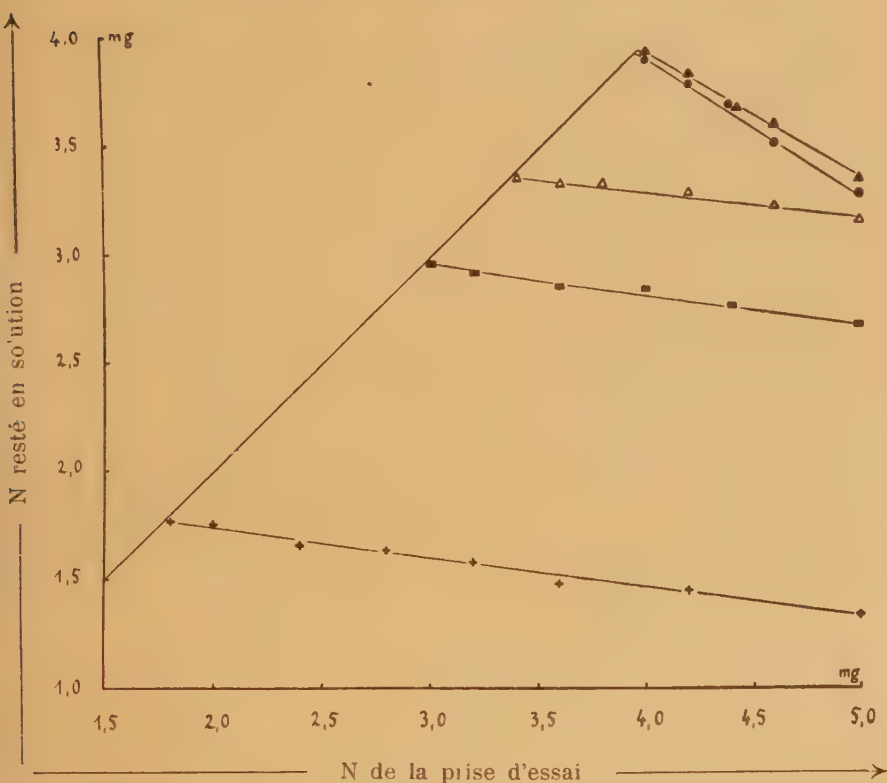


Fig. 7.

Légende.

- ▲ ornithine
- lysine
- arginine
- + histidine
- △ cystine

téoses » et des « synprotéoses » (voir p. 24). Ces albumoses sont, il est vrai, tellement proches des protéines qu'en fait, elles n'ont des polypeptides que le nom ; nous en ferons d'ailleurs abstraction quand nous parlerons, désormais, de polypeptides.

Pouvoir précipitant de l'acide lutéophosphotungstique sur les polypeptides.

Si l'on se reporte à la figure 6 (p. 72), on voit que lorsqu'on passe du tryptophane au glycyl-tryptophane, du seul fait de l'alourdissement de la molécule par un chaînon de glycine : ($-\text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$), les concentrations de précipitation initiale par l'acide lutéophosphotungstique se trouvent abaissées de 80 à 120 mg par litre (exprimées en azote).

D'après cette constatation, il y a tout lieu de supposer qu'en règle générale, la précipitation des polypeptides par l'acide lutéophosphotungstique doit s'obtenir à partir de concentrations d'autant plus faibles que leur condensation est plus élevée et que les lutéophosphotungstates des acides aminés correspondants sont moins solubles.

L'action de l'acide lutéophosphotungstique sur la peptone de WITTE, substance riche en polypeptides de haut poids moléculaire, confirme pleinement cette hypothèse ; comme le montrent les résultats du tableau X, cet acide précipite en effet la peptone de façon très poussée.

TABLEAU X

Titre de la solution de phosphotungstate mise en œuvre <i>en g p. 100 cm³</i>	PEPTONE DE WITTE
	Concentration donnant lieu à la précipitation initiale à 21°
	<i>en mg N p. litre</i> (Technique de défécation habituelle)
10	120
7,5	120
5	80
2,5	80
0,5	< 40

Ces résultats sont à rapprocher d'observations concordantes de CRISTOL ([27], pp. 85-86) sur la précipitation lutéophosphotungstique de la peptone de caséine.

Dans les conditions de notre étude et à la température ordinaire (21°-22°), l'acide lutéophosphotungstique doit donc précipiter les polypeptides dès les concentrations suivantes :

TABLÉAU XI

Nature du polypeptide	Concentration donnant lieu à la précipitation initiale à 21°-22° en mg N p. litre	
	Par le lutéophos- photungstate Na à 10 p. 100	En l'absence de tout excès d'acide lutéophospho- tungstique
P. à base d'arginine	< 600	< 90
P. à base d'histidine	< 360	< 110
P. à base de lysine	< 800	< 170
P. à base d'ornithine	< 800	< 220
P. à base de cystine	< 680	< 420
P. à base de tryptophane .	—	< 1000 à partir des tri ou tétra-peptides.
Autres polypeptides	—	< 1000 pour les poly- peptides hautement condensés.

D'une façon plus précise, considérant que l'addition d'un simple chaînon de glycine suffit à abaisser la concentration de précipitation initiale du tryptophane d'au moins 80 mg par litre (exprimée en azote), on peut admettre qu'en l'absence de tout excès d'acide lutéophosphotungstique, les polypeptides à base d'acides diamminés, notamment d'arginine ou d'histidine, ceux à base de cystine et tous ceux de haute condensation, sont à peu près complètement précipités. C'est d'ailleurs ce que laissent pressentir les résultats de notre expérimentation sur la peptone de WITTE (tableau X) : la concentration de précipitation initiale de cette substance par l'acide lutéophosphotungstique tend, en effet, vers zéro lorsque décroît le titre de la solution phosphotungstique employée.

§ 3. — Interprétation des résultats

du point de vue de la composition du double azote.

Lorsqu'on désalbumine un sérum sanguin suivant la technique de CRISTOL, en raison de l'abondance des éléments précipités, tout l'acide lutéophosphotungstique mis en œuvre est normalement fixé (1). En toute exactitude, les concentrations donnant lieu à la précipitation initiale des composés azotés du sang par la désalbumination de CRISTOL, sont donc, non celles relatives aux défécations par le lutéophosphotungstate de sodium à 10 p. 100 (voir tableau VII, p. 70), mais celles que l'on observerait en l'absence de tout excès d'acide phosphotungstique (voir tableaux VIII, p. 73, et XI, p. 79).

Dans ces conditions, à supposer que leur concentration dans le sérum atteigne des valeurs suffisantes, les composés azotés à ranger parmi les constituants du double azote seraient, à l'exclusion de tous autres :

1^o L'arginine, l'histidine, la lysine, l'ornithine et la cystine, dans la mesure où leur concentration respective dépasserait 90, 110, 170, 220 et 420 mg par litre (exprimée en azote).

2^o Les polypeptides à base d'acides diamminés ou de cystine, dans la mesure où leur concentration dépasserait, suivant leur nature et leur condensation, quelques milligrammes ou quelques dizaines de milligrammes par litre (toujours en azote).

3^o Enfin, les polypeptides, quels qu'ils soient, de haute condensation, dans la mesure où leur concentration dépasserait également quelques milligrammes par litre.

(1) Exceptionnellement, cette fixation peut être incomplète dans les cas d'hydrémie.

A partir des concentrations indiquées, ces divers composés seraient, en effet, précipités par la désalbumination de CRISTOL (voir tableau VIII, p. 73, et XI, p. 79), alors qu'ils échappent entièrement à celle de MOOG (voir p. 68).

Des composés ci-dessus, quels sont ceux qu'on peut effectivement considérer comme prenant part à l'existence du double azote ?

1° *Cas des acides diaminés et de la cystine.*

On sait que la teneur du sérum sanguin en acides aminés *totaux*, exprimée en azote, reste pratiquement inférieure à 300 ou 400 mg par litre — teneurs pathologiques extrêmes — cependant qu'à l'état normal elle oscille de 70 à 90 mg par litre (1).

Il semble donc qu'aucun des acides aminés envisagés ne doive contribuer à l'existence du double azote, à l'exception, peut-être, des bases hexoniques — notamment de l'arginine — dans les amino-acidémies très élevées.

2° *Cas des polypeptides à base d'acides diaminés ou de cystine.*

Les conclusions auxquelles nous sommes précédemment arrivé (voir p. 79) permettent de regarder les polypeptides à base d'acides diaminés ou de cystine, ceux surtout riches en arginine ou en histidine, comme les constituants du double azote par excellence ; dès les tri ou tétra-peptides, leur précipitation complète paraît, en effet, assurée par la défécation de CRISTOL.

3° *Cas des polypeptides de haute condensation.*

Qu'ils renferment, ou non, des acides diaminés ou de la cystine, ces polypeptides sont, de même, à ranger parmi les constituants du double azote.

(1) Toujours en azote *total* et non uniquement en azote α aminé.

En résumé, d'après nos résultats du § 2, les composés responsables de l'existence du double azote sont essentiellement les polypeptides à base d'acides diaminés ou de cystine et ceux, quels qu'ils soient, de haute condensation.

* * *

Telle que nous venons de le préciser, la composition qualitative du double azote ne saurait être considérée comme étant d'une exactitude absolue ; en raison des phénomènes d'adsorption qui peuvent accompagner les désalbuminations, l'action des acides trichloracétique et lutéophosphotungstique sur les constituants d'un sérum n'est pas, en effet, nécessairement identique à l'action de ces mêmes acides sur des composés en solutions pures.

Quoi qu'il en soit, les indications données répondent à la composition qualitative, sinon effective, du moins théorique du double azote ; nous verrons plus loin (ch. II) en quoi diffèrent ces deux compositions.

CHAPITRE II

ACTION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE ET DE L'ACIDE LUTÉOPHOSPHOTUNGSTIQUE SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS DU SANG EN SOLUTION DANS DU SÉRUM

Dans cette étude, nous nous sommes proposé de préciser quelle était l'influence des phénomènes d'adsorption sur la composition du double azote. A cet effet, nous avons repris notre expérimentation précédente sur le pouvoir précipitant des défécations de MOOG et de CRISTOL (2^e partie, ch. I) en opérant sur des composés, non plus en solution aqueuse, mais en solution dans du sérum.

Tenant compte des valeurs extrêmes que peut atteindre la teneur du sérum en ses divers constituants azotés non protéiques (voir p. 65), nous avons fait porter nos déterminations sur des sérums normaux enrichis des quantités de composé suivantes :

Composé	Quantité ajoutée au sérum en mg N p. litre
Urée	3.000
Acide urique et créatinine	100
Créatine	50
Acides aminés et polypeptides ...	200

Tout essai s'accompagnant ici d'une précipitation, nous nous sommes évidemment borné à rechercher, dans chaque cas, quel était le pourcentage de composé ajouté précipité.

§ 1. — Technique.

Préparation des solutions d'expérience. — La mise en solution d'un acide aminé, d'un polypeptide ou de tout autre composé dans du sérum sanguin étant malaisée à réaliser, nous avons préparé nos solutions d'expérience indirectement, à la faveur des désalbuminations.

Dans nos recherches sur la désalbumination de CRISTOL (1 vol. sérum + 1 vol. solution de lutéophosphotungstate de sodium à 10 p. 100 + 2 vol. H_2O + 1 vol. SO_4H_2 2N/3), nous avons incorporé les composés étudiés au sérum simplement en renversant l'ordre d'addition de l'eau et de la solution phosphotungstique — ce qui, nous l'avons vérifié, ne change en rien les résultats — et en substituant un volume convenable de la solution mère précédemment définie (p. 63) du composé expérimenté à un égal volume de l'eau de dilution.

Dans nos recherches sur la désalbumination de MOOG, cette désalbumination ne comportant pas d'addition d'eau au sérum, nous lui avons, ici, exceptionnellement préféré le mode de désalbumination trichloracétique au cinquième par lequel nous avons antérieurement montré qu'on pourrait la remplacer (voir 1^{re} partie, ch. IV) ; le recours à ce mode nous a permis d'incorporer les composés étudiés au sérum de la même façon que dans nos recherches sur la désalbumination de CRISTOL.

Détermination des pourcentages de composé précipités. — Pour obtenir les pourcentages de composé précipités, nous avons dosé comparativement les azotes totaux trichloracétique et lutéophosphotungstique relatifs aux mélanges *sérum-composé* et ceux des sérums initiaux correspondants; les différences observées, rapportées aux quantités de composé ajoutées aux sérums, nous ont donné les pourcentages de composé restés en solution, d'où nous avons déduit les pourcentages précipités cherchés.

MODE OPÉRATOIRE.

1° Etude du pouvoir précipitant de la désalbumination trichloracétique.

Dans un verre à pied, nous introduisons dans l'ordre, en mélangeant soigneusement :

Sérum normal.....	5 cm ³
Solution mère du composé envisagé	n cm ³ (1)
Eau distillée	(7,5 — n) cm ³
Solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100	12,5 cm ³

Le précipité formé filtré, nous dosons l'azote total du liquide clair sur une prise convenable et rapportons le résultat au litre de sérum. Soit N_T la valeur ainsi trouvée, autrement dit, l'azote total trichloracétique du mélange *sérum-composé* traité.

Si N_t et N_c représentent respectivement l'azote total trichloracétique du sérum initial — préalablement déterminé après même désalbumination au cinquième — et la quantité de composé ajoutée au sérum (exprimée en mg N par litre), nous obtenons le pourcentage de composé précipité d'après la relation :

$$\text{Composé précipité p. 100} = 100\left(1 - \frac{N_T - N_t}{N_c}\right).$$

(1) n étant égal à 3 cm³ dans le cas de l'urée (solution mère à 5 g N par litre), à 0,5 cm³ dans le cas de l'acide urique et de la créatinine, à 0,25 cm³ dans le cas de la créatine, enfin à 1 cm³ dans tous les autres cas.

2° Etude du pouvoir précipitant de la désalbumination
lutéophosphotungstique.

Dans un verre à pied, nous introduisons dans l'ordre, en agitant :

Sérum normal	5 cm ³
Solution mère du composé envisagé	n cm ³ (1)
Eau distillée	(10 — n)cm ³
Solution de lutéophosphotungstate de Na à 10 p. 100	5 cm ³
Acide sulfurique 2N/3	5 cm ³

Soit N_L l'azote total lutéophosphotungstique du mélange *sérum-composé* traité, déterminé sur une partie aliquote du filtrat.

Si N_I et N_c représentent respectivement l'azote total lutéophosphotungstique du sérum initial et, toujours en mg N par litre, la quantité de composé ajoutée au sérum, nous avons ici :

$$\text{Composé précipité p. 100} = 100(1 - \frac{N_L - N_I}{N_c})$$

§ 2. — Résultats.

I. — Pouvoir précipitant de la désalbumination trichloracétique.

Nos résultats relatifs à la désalbumination trichloracétique sont réunis dans le tableau XII.

(1) Même remarque que la précédente, p. 85.

<i>en mg. N. par litre</i>	Mélange	Sérum initial	Différenc.	p. 100	<i>en mg. N. par litre</i>	Mélange	Sérum initial	Différenc.	p. 100
Urée.....	3210	246	2964	1,2	Phényl-alanine....	496	304	192	4
Acide urique ...	342	246	96	4	Tyrosine	380	190	190	5
Créatinine	450	350	100	0	Proline	442	256	186	7
Créatine	246	198	48	4	Oxyproline	454	256	198	1
Glycine.....	474	280	194	3	Histidine	474	288	186	7
Alanine	478	280	198	1	Tryptophane ...	412	224	188	6
Valine	424	234	190	5	Cyclo-glycyl- glycine	428	238	190	5
Leucine	414	220	194	3	Glycyl-glycine ...	446	246	200	0
Sérine	494	302	192	4	Glycyl-leucine...	442	246	196	2
Acide aspartique	506	316	190	5	Glycyl-tyrosine..	388	194	194	3
Acide glutamiqu.	512	316	196	2	Glycyl-trypto- phane	548	358	190	5
Ornithine.....	372	184	188	6	Alanyl-glycine...	506	316	190	5
Lysine	374	184	190	5	Leucyl-glycine...	514	316	198	1
Arginine	470	278	192	4	Leucyl-tyrosine..	484	298	186	7
Cystéine	456	262	194	3	Glycyl-glycyl- glycine	434	238	196	2
Méthionine	456	262	194	3	Leucyl-glycyl- glycine	496	302	194	3
Cystine.....	450	262	188	6	Glutathion	534	340	194	3

TABLEAU XIII

Composé étudié	Quantité ajoutée au sérum <i>en mg N par litre</i>	N total lutéophosphotungstique <i>en mg par litre de sérum</i>			Composé précipité p. 100	Composé étudié	Quantité ajoutée au sérum <i>en mg N par litre</i>	N total lutéophosphotungstique <i>en mg par litre de sérum</i>			Composé précipité p. 100
		Mélange	Sérum initial	Différenc.				Mélange	Sérum initial	Différenc.	
Urée	3000	3186	212	2974	0,9	Phényl-alanine...	200	378	196	182	9
Acide urique ...	100	280	186	94	6	Tyrosine	200	388	192	196	2
Créatinine	100	300	238	62	38	Proline	200	372	174	198	1
Créatine	50	268	222	46	8	Oxyproline	200	358	174	184	8
Glycine.....	200	392	198	194	3	Histidine	200	324	286	38	81
Alanine.....	200	360	176	184	8	Tryptophane ...	200	358	232	126	37
Valine	200	374	176	198	1	Cyclo-glycyl- glycine	200	430	240	190	5
Leucine	200	460	264	196	2	Glycyl-glycine...	200	426	240	186	7
Sérine	200	368	178	190	5	Glycyl-leucine...	200	436	240	196	2
Acide aspartique	200	414	220	194	3	Glycyl-tyrosine.,	200	388	198	190	5
Acide glutamiqu.	200	408	220	188	6	Glycyl-trypto- phane	200	260	168	92	54
Ornithine.....	200	300	242	58	71	Alanyl-glycine...	200	448	254	194	3
Lysine	200	316	278	38	81	Leucyl-glycine...	200	376	182	194	3
Arginine	200	204	154	50	75	Leucyl-tyrosine.,	200	444	258	186	7
Cystéine	200	380	188	192	4	Glycyl-glycyl- glycine	200	444	250	194	3
Méthionine	200	346	156	190	5	Leucyl-glycyl- glycine	200	442	250	192	4

D'après ces résultats, on voit que le pouvoir précipitant de notre mode de désalbumination au cinquième — et par conséquent, de la désalbumination équivalente de MOOG — sur les composés étudiés est négligeable ; ces composés ne sont en effet retenus que dans des proportions le plus souvent inférieures à 5 p. 100 (en moyenne : 3,7 p. 100) et dépassant exceptionnellement 6 p. 100 (proline, histidine et leucyl-tyrosine : 7 p. 100).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par CRISTOL et SIMONNET et par MARTENS dans l'étude du pouvoir précipitant de la désalbumination de MOOG, les premiers, sur des sérums additionnés de créatine (CRISTOL et SIMONNET [29]), le deuxième, sur des sérums additionnés de proline, de bases hexoniques, de leucyl-glycyl-glycine ou de glutathion (MARTENS [11]).

II. — Pouvoir précipitant de la désalbumination lutéophosphotungstique.

Nous avons rapporté nos résultats concernant la désalbumination lutéophosphotungstique dans le tableau XIII.

Ces résultats montrent que dans le cas de la désalbumination de CRISTOL, les composés étudiés sont précipités :

a) quelques-uns, dans des pourcentages notables, ce sont : les acides diamminés (71 à 81 p. 100), la cystine (80 p. 100), le glycyl-tryptophane (54 p. 100), la créatinine (38 p. 100) et le tryptophane (37 p. 100) ;

b) les autres, dans des proportions négligeables, généralement inférieures à 5 p. 100 (en moyenne : 4,5 p. 100) et exceptionnellement supérieures à 8 p. 100 (phényl-alanine : 9 p. 100).

Étudiant également l'action de la désalbumination de CRISTOL sur des composés mis en solution dans du sérum, MARTENS [11] est parvenu aux résultats suivants :

Composé étudié	Quantité ajoutée au sérum <i>en mg N par litre</i>	Composé précipité p. 100
Lysine	38,37	84,4
Arginine	29,80	53,0
Histidine	90,30	11,4
Proline	73,64	0,0
Leucyl-glycyl-glycine .	68,56	2,3
Glutathion	78,17	4,1

En réalité, ces pourcentages précipités se rapportent certainement (voir p. 28), non à l'action de la désalbumination de CRISTOL, mais à celle, quelque peu différente, de l'acide phosphoduodécitungstique ; il n'y a donc pas lieu de les prendre en considération ici.

§ 3. — Interprétation des résultats ;

conséquences du point de vue de la composition du double azote.

I. — Phénomènes d'adsorption accompagnant la désalbumination de Moog.

La comparaison des résultats du tableau XII (p. 87) à ceux de nos recherches homologues sur les composés azotés du sang en solution aqueuse (voir p. 68) démontre que la désalbumination de MOOG donne lieu à une minime adsorption des composés expérimentés, les pourcentages de composé adsorbés restant inférieurs à 5 ou 10 p. 100 ; l'acide trichloracétique n'ayant aucun pouvoir précipitant sur les composés en solution aqueuse, les pourcentages précipités du tableau XII répondent, en effet, à l'action des phénomènes d'adsorption.

Il est intéressant de constater que les pourcentages d'adsorption relatifs aux di et tri-peptides (en moyenne : 3,3 p. 100) sont du même ordre que ceux trouvés pour les autres composés (en moyenne : 3,9 p. 100). Plus généralement, les recherches déjà rappelées (p. 76) d'HALLIBURTON [38], de STARLING [39], de MARTIN [40], d'HILLER et VAN SLYKE [41] et de CRISTOL (CRISTOL et PUECH [1], CRISTOL [27]) nous paraissent établir qu'à l'exception, peut-être, de certaines albumoses, les poly-peptides de condensation élevée présents dans le sang ne seraient eux-mêmes adsorbés au cours de la désalbumination de MOOG que dans de faibles proportions ; comme le montrent les résultats du tableau XIV, c'est d'ailleurs ce que confirme pleinement l'étude comparative de l'action de la défécation de MOOG sur la peptone de WITTE en solution aqueuse et en solution dans du sérum.

TABLEAU XIV

Peptone mise en expérience <i>en mg N p. litre</i>	Peptone retrouvée dans le filtrat trichloracétique <i>en mg N p. litre de solution initiale</i>			Peptone adsorbée p. 100
	Filtrat provenant de la solution aqueuse	Filtrat provenant de la solution dans du sérum	Différence	
50	46	40	6	12
200	156	128	28	14
400	284	240	44	11

En définitive, il nous paraît permis de conclure que d'une façon générale, les phénomènes d'adsorption n'ont qu'une influence négligeable sur le comportement des composés azotés non protéïdiques du sang au cours de la désalbumination de MOOG, le pourcentage adsorbé de chacun d'eux restant inférieur à 10 p. 100 ou s'élevant exceptionnellement entre 10 et 15 p. 100 (peptone de WITTE : 11 à 14 p. 100).

II. — Phénomènes d'adsorption accompagnant la désalbumination de Cristol.

Nous avons précédemment montré (p. 80) qu'en toute exactitude, les concentrations donnant lieu à la précipitation initiale théorique des composés azotés du sérum sanguin par la désalbumination de CRISTOL étaient celles relatives à la défécation de leurs solutions aqueuses en l'absence de tout excès d'acide lutéophosphotungstique.

En ce qui concerne les composés expérimentés, nous avons pu attribuer à ces concentrations les valeurs suivantes (cf. tableau VIII, p. 73) :

Composé	Concentration théorique donnant lieu à la précipitation initiale par la désalbumination de Cristol
	en mg N p. litre
Arginine	90
Histidine	110
Lysine	170
Ornithine	220
Cystine	420
Glycyl-tryptophane	> 520
Tryptophane	> 640
Créatinine	> 1.070
Urée	> 5.000
Autres composés expérimentés ...	> 1.000

Ainsi, à l'exception de l'arginine, de l'histidine et de la lysine, aucun des composés expérimentés n'est théoriquement précipitable par la désalbumination de CRISTOL à la concentration à laquelle il se trouve dans nos mélanges *sérum-composé* (voir p. 84) ; hormis ceux afférents aux bases hexoniques, les pourcentages précipités du tableau XIII (p. 88) répondent donc à l'action des phénomènes d'adsorption.

Dans nos essais sur les sérums additionnés d'arginine, d'histidine ou de lysine, ces acides diamminés étant d'eux-mêmes précipitables dans la mesure où leur concentration respective dépasse 90, 110 et 170 mg par litre (exprimée en azote), l'action des phénomènes d'adsorption porte seulement sur les pourcentages de composé suivants (tableau XV) :

TABLEAU XV

Composé étudié	P. 100 précipité par la désalbumination de Cristol		Composé adsorbé p. 100 (Différence)
	Effectif	Théorique	
Arginine	75	$\frac{200 - 90}{2} = 55$	20
Histidine	81	$\frac{200 - 110}{2} = 45$	36
Lysine	81	$\frac{200 - 170}{2} = 15$	66

On voit que dans le cas de la désalbumination de CRISTOL, l'influence des phénomènes d'adsorption sur le comportement des composés expérimentés est des plus inégales, la créatinine, les acides diamminés, la cystine, le tryptophane et le glycyl-tryptophane étant adsorbés dans un pourcentage supérieur ou égal à 20 p. 100, les autres composés n'étant retenus que dans des proportions négligeables, comparables à celles fixées dans le cas de la désalbumination de MOOG (moins de 5 à 10 p. 100).

En ce qui concerne les polypeptides à base d'acides diamminés ou de cystine et ceux, quels qu'ils soient, de haute condensation, la question de l'adsorption ne saurait ici se poser ; comme nous l'avons établi (2^e partie, ch. I, § 2), la précipitation complète de ces polypeptides est, en effet, pratiquement assurée par la désalbumination de CRISTOL, en dehors de tout phénomène d'adsorption.

Enfin, en ce qui concerne les polypeptides peu condensés à base de tryptophane autres que le glycyl-tryptophane, on peut admettre que suivant leur nature et leur condensation, leurs proportions retenues varient de 54 à 100 p. 100.

On conçoit difficilement que les phénomènes d'adsorption accompagnant la désalbumination de CRISTOL portent sur des pourcentages aussi élevés de glycyl-tryptophane (54 p. 100), de cystine (80 p. 100), d'ornithine (71 p. 100), alors qu'ils atteignent si peu le glutathion (5. p. 100), la méthionine (5 p. 100), la leucine (2 p. 100).

En toute exactitude, la fixation de la créatinine, des acides diamminés, de la cystine, du tryptophane et du glycyl-tryptophane dans les inhabituelles proportions notées nous paraît effectivement résulter, non d'une adsorption particulièrement prononcée de ces composés, mais de leur combinaison préalable aux constituants du sérum à l'état de dérivés — par exemple de di ou tri-peptides — directement précipitables dans les conditions de la désalbumination de CRISTOL.

Un certain nombre de faits corroborent cette hypothèse :

a) Parmi les composés expérimentés, la créatinine, les acides diamminés, la cystine, le tryptophane et le glycyl-tryptophane sont précisément les plus *réactifs*, le premier, par son azote iminé rattaché à un cycle, les seconds, par leur double fonction amine, le troisième, par sa fonction disulfure, enfin les deux derniers, par leur noyau indol.

b) Ces composés sont en même temps ceux dont les lutéophosphotungstates sont les moins solubles et dès une très faible condensation, leurs polypeptides sont entièrement précipités par la désalbumination de CRISTOL en dehors de tout phénomène d'adsorption (voir 2^e partie, ch. I, § 2).

c) Enfin, si l'on compare leurs pourcentages précipités du tableau XIII (p. 88) à ceux qu'on observe dans le cas de sérums à 50 mg par litre, seulement, de composé (tableau XVI), on

constate que la diminution de la quantité de composé ajoutée au sérum ne modifie guère l'étendue des précipitations ; or, étant donné les quantités de créatinine, d'acides diamminés, de cystine, de tryptophane et de glycyl-tryptophane apparemment adsorbées dans nos essais du tableau XIII, l'adsorption complète de la plupart de ces composés devrait être de règle jusqu'à des concentrations très supérieures à 50 mg par litre.

TABLEAU XVI

Étudié	Essais du tableau XIII		Essais complémentaires		
	Quantité ajoutée au sérum <i>en mg N</i> <i>p. litre</i>	Quantité apparemment adsorbée <i>en mg N</i> <i>p. litre de sérum</i>	Quantité ajoutée au sérum <i>en mg N</i> <i>p. litre</i>	N ph. tungstique mélange moins N ph. tungstique sérum initial <i>en mg p. litre</i> <i>de sérum</i>	Composé précipité <i>p. 100</i>
ie	100	38 (a)	50	30	40
e	200	142 (a)	50	12	76
.....	200	132 (b)	50	10	80
.....	200	40 (b)	50	14	72
.....	200	160 (a)	50	8	84
.....	200	72 (b)	50	12	76
ane .	200	74 (a)	50	28	44
trypto-	200	108 (a)	50	20	60

(a) D'après les pourcentages précipités du tableau XIII.

(b) D'après les pourcentages adsorbés du tableau XV.

Ainsi, les véritables phénomènes d'*adsorption* accompagnant la désalbumination de CRISTOL, n'influeraient pas plus sur le comportement de la créatinine, des acides diaminés, de la cystine, du tryptophane et du glycyL-tryptophane que sur celui des autres composés expérimentés et la précipitation des premiers dans des pourcentages élevés signifierait seulement qu'ils sont peu susceptibles d'exister et de subsister à l'état libre dans le sérum sanguin.

Du point de vue qui nous occupe, les pourcentages de composé apparemment adsorbés n'en restent pas moins les seuls pourcentages d'adsorption à considérer ; seuls, en effet, ils expriment les différences dûment constatées entre le pouvoir précipitant théorique et le pouvoir précipitant effectif de la désalbumination de CRISTOL sur les composés azotés non protéidiques du sérum sanguin.

* * *

Étant donné les phénomènes d'adsorption — ou apparemment tels — accompagnant les désalbuminations de MOOG et de CRISTOL, quels vont être, en définitive, les composés réellement responsables de l'existence du double azote et les fractions de ces composés y prenant part ?

Pour résoudre la question, il suffit de comparer, comme nous l'avons fait dans le tableau XVII, les pourcentages de composé adsorbés du tableau XII (p. 87) aux pourcentages de composé adsorbés et éventuellement précipités des tableaux XIII (p. 88) ou XVI (p. 95).

TABLÉAU XVII

Composé	P. 100 adsorbé par la désalbumination de Moog	P. 100 adsorbé et précipité par la désalbumination de Cristol	P. 100 prenant part à l'existence du double azote (Différence)
inine	0	38 à 40	38 à 40
hine	6	71 à 76	65 à 70
ne	5	80 à 81	75 à 76
tine	4	72 à 75	68 à 71
ne	6	80 à 84	74 à 78
dine	7	76 à 81	69 à 74
tophane	6	37 à 44	31 à 38
yl-tryptophane	5	54 à 60	49 à 55
es polypeptides peu condensés à base de tryptophane	0 à 10	54 à 100	44 à 100
ptides à base d'acides aminés ou de cystine	0 à 10	environ 100 (a)	90 à 100 (a)
ptides de haute condensation	10 à 15 (b)	environ 100	85 à 90
es composés azotés non protéiques du sérum sanguin.	0 à 10	0 à 10	environ 0

(a) Tout au moins à partir des tri ou tétra-peptides.

(b) D'après les adsorptions constatées dans le cas de la peptone de WITTE.

On voit qu'en dehors des bases hexoniques, des polypeptides à base d'acides diamminés ou de cystine et des polypeptides de haute condensation, composés dont nos conclusions du chapitre précédent faisaient les seuls constituants du double azote (voir p. 81), la créatinine, l'ornithine, le tryptophane et les polypeptides peu condensés à base de tryptophane sont encore à ranger parmi ces constituants.

Les composés réellement responsables de l'existence du double azote sont donc, non seulement de nombreux polypeptides, mais encore, la créatinine, le tryptophane, l'ornithine, les bases hexoniques et la cystine. Toutefois, considérant que ces derniers composés nous sont apparus comme peu susceptibles d'exister à l'état libre dans le sang (voir p. 96), il nous paraît permis de conclure que les constituants du double azote sont essentiellement des polypeptides : polypeptides à base d'acides diaminés ou de cystine et polypeptides de haute condensation, notamment.

CHAPITRE III

ACTION DE LA PERMUTITE SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS DU SANG ET SUR LES FILTRATS DE MOOG ET DE CRISTOL

Les recherches précédentes nous ont montré que les polypeptides à base d'acides diaminés et, le cas échéant, les acides diaminés eux-mêmes, se classaient parmi les constituants par excellence du double azote.

L'étude de l'action de la permutite sur les composés azotés non protéidiques du sang et sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL va maintenant nous permettre de préciser la teneur des filtrats en azote total diaminé, et par là, la part revenant aux acides diaminés et aux polypeptides d'acides diaminés dans l'existence de l'indice de polypeptidémie.

§ 1. — Permutite et permutations.

La *permutite* est une zéolithe synthétique répondant approximativement à la formule : $2\text{SiO}_2, \text{O}_3\text{Al}_2, \text{ONa}_2 + 6\text{HO}_2$.

Avec certains composés — sels ammoniacaux, amines, etc. — en solution aqueuse, la permutite donne des réactions d'équilibre du type :



La permutite et ses dérivés étant insolubles, ces réactions aboutissent à la fixation de radicaux : $R \dot{N}H_3$ —, et à la libération de quantités de sodium équivalentes ; aussi, les appelle-t-on : réactions de *permutation*.

Comme toutes les réactions d'équilibre, les réactions de permutation obéissent à la loi d'action de masse, et ont une vitesse finie qui varie avec la température ; par ailleurs, ces réactions sont partiellement empêchées quand on s'éloigne de la neutralité (WHITEHORN [109]).

Pour réaliser des permutations complètes — ou pratiquement telles — il est, par suite, indispensable :

1° De mettre en œuvre une quantité de permutite suffisamment importante par rapport à la quantité de composé à fixer.

2° De faire agir la permutite à une température et pendant un temps convenables.

3° Enfin, d'opérer sur une solution neutre.

ÉTUDE DE L'ACTION DE LA PERMUTITE :

TECHNIQUE SUIVIE DANS NOS RECHERCHES.

Pour préciser l'action de la permutite sur les composés azotés du sang et sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL, nous avons soumis composés et filtrats à cette action dans des conditions appropriées et nous avons recherché :

- en ce qui concerne les composés azotés, quel était leur pourcentage fixé respectif ;
- en ce qui concerne les filtrats, quelle était la perte d'azote de chacun d'eux.

Technique.

a) Nous avons effectué nos essais de permutite suivant la technique pratique de WHITEHORN [109].

Cette technique consiste à filtrer la solution étudiée, préalablement neutralisée s'il est nécessaire, sur une quantité suffisante de permutite. Les produits de la réaction étant ici éliminés au fur et à mesure de leur formation, on parvient rapidement, et au moyen de quantités relativement minimales de permutite, à des permutations très complètes.

Selon WHITEHORN [109, p. 762], dans une filtration à la température ordinaire et à la vitesse d'une goutte par seconde, 3 g de permutite seraient capables de fixer entièrement 26,2 mg d'azote ammoniacal, que la solution traitée ait un volume de 5, de 50 ou de 100 cm³. Tenant compte de ces indications, nous avons opéré dans les conditions suivantes :

1° nous sommes parti de prises d'essai renfermant moins de 20 mg d'azote, et de volume inférieur à 30 cm³ ;

2° nous avons exactement neutralisé par l'acide chlorhydrique ou la soude ;

3° nous avons étendu à 50 cm³ avec de l'eau distillée ;

4° nous avons enfin filtré sur 5 g de permutite, à la température ordinaire (20°) et à la vitesse de 45 à 50 gouttes par minute.

b) Dans nos essais sur les composés azotés du sérum sanguin, nous avons déduit le pourcentage fixé de chacun d'eux des pourcentages restés en solution, eux-mêmes obtenus en dosant l'azote total des solutions permutes et en rapportant les résultats à l'azote total, connu, des prises d'essai correspondantes.

c) Enfin, nous avons obtenu la perte d'azote des filtrats de MOOG et de CRISTOL en comparant leur teneur en azote avant et après permutation.

*
*
*

Il existe différentes sortes de permutite dans le commerce. Dans nos recherches, nous nous sommes uniquement servi de permutite à grains fins (grains à la maille 60-80), vérifiée exempte d'ammoniaque et spécialement préparée à l'usage des laboratoires (1).

§ 2. — Action de la Permutite sur les composés azotés du sang.

Dans cette étude, nous avons d'abord établi quelle était l'action de la permutite sur les composés azotés du sang en solutions purement aqueuses, ou pratiquement telles ; à cet effet, nous avons directement expérimenté sur les solutions mères précédemment définies (p. 63). Nous avons ensuite recherché si une addition préalable d'acide trichloracétique dans les conditions de la désalbumination de MOOG, ou d'acide lutéophosphotungstique dans les conditions de la désalbumination de CRISTOL, étaient de nature à modifier cette action.

I. — Etude des solutions aqueuses.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, bouchant à l'émeri, nous introduisons 2 cm³ (ou 8 cm³) de solution mère à un gramme d'azote par litre du composé envisagé et les neutralisons exactement par l'acide chlorhydrique ou la soude N/50 en présence d'une goutte de solution alcoolique de phénol-phtaléine. Nous étendons le liquide neutralisé jusqu'au trait avec de l'eau distillée, agitons, puis filtrons sur 5 g de permutite disposés

(1) Permutite de la *Permutit Company*, 330 w, 42^e rue à New-York (permutite « *prepared according to Folin* »).

dans un entonnoir filtrant d'*Iéna* n° 15 a G 1 (1). Nous dosons enfin l'azote total de la solution permutée sur une prise de 5 cm³ et rapportons le résultat à 50 cm³, volume total théorique de cette solution.

Si N_r et N_e représentent, respectivement, le résultat trouvé et la quantité d'azote mise en expérience, nous obtenons le pourcentage de composé fixé d'après la relation :

$$\text{Composé fixé p. 100} = 100(1 - \frac{N_r}{N_e}).$$

Nota. — La neutralisation des solutions mères de cystine et de tyrosine s'accompagnant d'une certaine précipitation, nous n'avons pas compris ces composés dans la présente expérimentation.

RÉSULTATS.

Nos résultats sont réunis dans le tableau XVIII (p. 104).

On voit que l'action de la permutite sur les composés azotés du sang en solutions purement aqueuses se traduit, comme nous l'avons déjà signalé (CRISTOL et FOURCADE [110, 111]) :

1° Pour l'ornithine et les bases hexoniques (lysine, arginine et histidine), par une fixation atteignant 93 à 99 p. 100, donc, quasiment complète.

2° Pour les autres composés étudiés, par une fixation minime, généralement inférieure à 10 p. 100 et atteignant au maximum 15 à 15,5 p. 100 (tryptophane, acide glutamique).

Dans une expérimentation analogue, WHITEHORN [109] a recherché le pouvoir adsorbant de la permutite pour un grand nombre de composés azotés, dont quelques-uns des précédents. Suivant cet auteur, normalement, la permutite fixerait les composés présentant une constante de dissociation basique supé-

(1) Entonnoir qui assure les filtrations à la vitesse voulue (45 à 50 gouttes par minute).

TABLEAU XVIII

Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés	Composé fixé p. 100	Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés	C
Urée	2	1,98	1	Méthionine	2	1,84	
<i>id.</i>	8	7,62	5	Phényl-Alanine	2	1,74	
Acide urique	2	1,84	8	Proline	2	1,90	
<i>id.</i>	8	6,84	14,5	<i>id.</i>	8	7,46	
Créatinine	2	1,82	9	Oxyproline	2	1,74	
<i>id.</i>	8	7,56	5,5	<i>id.</i>	8	7,00	
Créatine	2	1,80	10	Histidine	2	0,12	
<i>id.</i>	8	7,26	9	<i>id.</i>	8	0,28	
Glycine	2	1,98	1	Tryptophane	2	1,70	
<i>id.</i>	8	7,60	5	<i>id.</i>	8	7,34	
Alanine	2	1,82	9	Cyclo-glycyl- glycine	2	1,86	
<i>id.</i>	8	7,42	7	Glycyl-glycine	2	1,84	
Valine	2	1,78	11	<i>id.</i>	8	7,72	
<i>id.</i>	8	7,10	11	Glycyl-leucine	2	1,86	
Leucine	2	1,88	6	<i>id.</i>	8	7,32	
Sérine	8	7,58	5	Glycyl-tyrosine	8	7,36	
Acide aspartique	2	1,74	13	Glycyl-trypto- phane	2	1,76	
Acide glutamique	2	1,78	11	Alanyl-glycine	2	1,92	
<i>id.</i>	8	6,76	15,5	<i>id.</i>	8	7,76	
Ornithine	2	0,10	95	Leucyl-glycine	2	1,86	
<i>id.</i>	8	0,18	98	<i>id.</i>	8	7,62	
Lysine	2	0,14	93	Leucyl-tyrosine	2	1,80	
<i>id.</i>	8	0,32	96	Glycyl-glycyl- glycine	2	1,76	
Arginine	2	0,06	97	<i>id.</i>	8	7,48	
<i>id.</i>	8	0,06	99	Leucyl-glycyl- glycine	2	1,82	
Cystéine	2	1,90	5	Glutathion	2	1,78	
<i>id.</i>	8	7,42	7	<i>id.</i>	8	7,34	

rieure ou égale à 5×10^{-9} ; ceci s'accorde pleinement avec nos résultats précédents : de tous les composés azotés du sérum sanguin envisagés dans notre étude, seules, en effet, l'ornithine et les bases hexoniques ont une constante de dissociation basique égale ou supérieure à 5×10^{-9} .

II. — Etude des solutions trichloracétiques.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, bouchant à l'émeri, nous introduisons 5 cm³ de solution mère à un gramme d'azote par litre du composé envisagé et un égal volume de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100 ; nous neutralisons exactement par addition de soude normale, puis d'acide chlorhydrique N/50, en présence d'une goutte de solution alcoolique de phénol-phtaléine ; enfin, nous poursuivons comme dans le cas des solutions purement aqueuses (voir pp. 102-103).

RÉSULTATS.

On trouvera nos résultats dans le tableau XIX (p. 106) qui reprend et complète nos chiffres antérieurement publiés (CRISTOL et FOURCADE [III]).

Ces résultats montrent que par action de la permutite sur les solutions trichloracétiques obtenues dans les conditions de la désalbumination de MOOG, on fixe :

1° Environ 60 p. 100 (51,5 à 76 p. 100) de l'ornithine et des bases hexoniques.

2° Un pourcentage très faible, au plus égal à 10 (phényl-alanine, leucyl-tyrosine), des autres composés étudiés.

En milieu trichloracétique, les proportions d'ornithine et de bases hexoniques fixées par la permutite sont donc inférieures de 30 à 40 p. 100 à celles fixées en solution purement aqueuse ;

Par ailleurs, la fixation des autres acides aminés, de l'urée, de l'acide urique, de la créatinine, de la créatine et des di et tri-peptides envisagés, devient pratiquement négligeable.

TABIEAU XIX

Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés	Composé fixé p. 100	Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés	Cor p.
Urée	5	4,92	1,5	Phényl-alanine ...	5	1,50	1
Acide urique	5	4,76	5	Tyrosine	5	1,92	
Créatinine	5	4,80	4	Proline	5	4,82	
Créatine	5	4,80	4	Oxyproline	5	4,98	
Glycine	5	4,86	3	Histidine	5	2,10	5
Alanine	5	4,74	5	Tryptophane	5	4,98	
Valine	5	4,86	3	Cyclo-glycyl-gly- cine	5	4,64	
Leucine	5	4,96	1	Glycyl-glycine ...	5	4,80	
Sérine	5	4,80	4	Glycyl-leucine ...	5	4,78	
Acide aspartique.	5	4,74	5	Glycyl-tyrosine ...	5	4,76	
Ac. glutamique ..	5	4,60	8	Glycyl-tryptoph...	5	4,56	
Ornithine	5	1,20	76	Alanyl-glycine ...	5	4,74	
Lysine	5	2,42	51,5	Leucyl-glycine ...	5	4,98	
Arginine	5	1,84	63	Leucyl-tyrosine ..	5	4 50	1
Cystéine	5	4,80	4	Glycyl-glycyl-gly- cine	5	4,60	
Méthionine	5	4,74	5	Leucyl-glycyl- glycine	5	4,76	
Cystine	5	4,54	9	Glutathion	5	4,94	

III. — Etude des solutions lutéophosphotungstiques.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, bouchant à l'émeri, nous introduisons, dans l'ordre, 5 cm³ de solution mère à un gramme d'azote par litre du composé envisagé, 10 cm³ d'eau distillée, 5 cm³ de solution de lutéophosphotungstate de sodium à 10 p. 100 et 5 cm³ d'acide sulfurique 2N/3 ; enfin, nous poursuivons comme dans nos essais en milieu trichloracétique (voir p. 105).

Nota. — Dans le cas de l'histidine, de l'arginine, de l'ornithine, de la lysine et de la cystine, pour éviter toute précipitation par l'acide lutéophosphotungstique, nous avons respectivement limité nos prises de solutions mères à : 1,5 cm³ (histidine), 2 cm³ (arginine) et 3 cm³ (ornithine, lysine et cystine). Nous avons toutefois opéré dans les conditions habituelles, après addition, non plus de 10 cm³, mais de 13,5 cm³, 13 cm³ ou 12 cm³ d'eau distillée.

RÉSULTATS.

Nous avons rapporté nos résultats dans le tableau XX (p. 108).

On constate que l'action de la permutite sur les solutions lutéophosphotungstiques obtenues dans les conditions de la désalbumination de CRISTOL, permet de fixer :

1^o Environ 80 p. 100 (75,5 à 84,5 p. 100) de l'ornithine et des bases hexoniques.

2^o En moyenne 5 à 6 p. 100 — et au maximum 11 p. 100 (acide aspartique) — des autres composés étudiés.

En milieu lutéophosphotungstique, la permutite fixe donc des proportions d'ornithine et de bases hexoniques inférieures de 10 à 20 p. 100 à celles retenues en solution purement aqueuse ; enfin, son pouvoir adsorbant pour les autres composés envisagés devient, comme en milieu trichloracétique, pratiquement négligeable.

TABLEAU XX

Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés	Composé fixé p. 100	Composé étudié	mg N mis en expérienc.	mg N retrouvés
Urée	5	4,60	8	Phényl-alanine ...	5	4,58
Acide urique	5	4,66	7	Tyrosine	5	4,80
Créatinine	5	4,72	5,5	Proline	5	4,84
Créatine	5	4,84	3	Oxyproline	5	4,74
Glycine	5	4,88	2,5	Histidine	1,5	0,34
Alanine	5	4,80	4	Tryptophane	5	4,98
Valine	5	4,90	2	Cyclo-glycyl-gly- cine	5	4,74
Leucine	5	4,88	2,5	Glycyl-glycine ...	5	4,90
Sérine	5	4,70	6	Glycyl-leucine ...	5	4,70
Acide aspartique.	5	4,46	11	Glycyl-tyrosine ...	5	4,70
Ac. glutamique ..	5	4,64	7	Glycyl-tryptoph... cine	5	4,68
Ornithine	3	0,46	84,5	Alanyl-glycine ...	5	4,82
Lysine	3	0,74	75,5	Leucyl-glycine ...	5	4,80
Arginine	2	0,36	82	Leucyl-tyrosine ..	5	4,48
Cystéine	5	4,92	1,5	Glycyl-glycyl-gly- cine	5	4,80
Méthionine	5	4,76	5	Leucyl-glycyl-gly- cine	5	4,66
Cystine	3	2,70	10	Glutathion	5	4,64

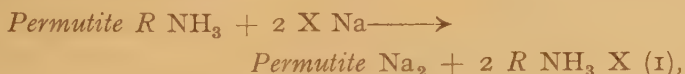
Cas des polypeptides.

En ce qui concerne les polypeptides, les résultats précédents n'ont trait qu'aux quelques di et tri-peptides étudiés.

Plus généralement, on peut logiquement admettre que les polypeptides renfermant de l'ornithine, de la lysine, de l'arginine ou de l'histidine se comportent, vis-à-vis de la permutite, comme ces acides diamminés, tandis que les autres polypeptides ne subissent pratiquement aucune fixation ; les résultats de nos recherches sur la teneur du sérum sanguin en azote peptidique trichloracétique et en azote peptidique lutéophosphotungstique (voir 2^e partie, ch. IV) confirment d'ailleurs pleinement cette hypothèse.

La moindre valeur du pouvoir adsorbant de la permutite en milieu trichloracétique et en milieu lutéophosphotungstique s'explique de la façon suivante :

En raison de leur forte acidité, les solutions trichloracétiques et lutéophosphotungstiques ne sont neutralisées que par une importante addition de soude, ce qui les enrichit en trichloracétate ou en lutéophosphotungstate de sodium. Dans ces conditions, l'équilibre des réactions de permutation (voir p. 99) est déplacé dans le sens :



les permutations devenant d'autant moins complètes que la concentration en sodium des solutions permutées est plus élevée, c'est-à-dire, que l'acidité des solutions initiales est plus grande.

L'acidité de 10 cm³ de filtrat de MOOG (environ 6,1 cm³ N) étant supérieure à celle de 25 cm³ de filtrat de CRISTOL (environ 3,35 cm³ N), on conçoit que le pouvoir adsorbant de la permutite ait été plus abaissé pour les solutions trichloracétiques que pour les solutions lutéophosphotungstiques.

(1) Les composés X Na, le trichloracétate de sodium et le lutéophosphotungstate de sodium sont, en effet, tous trois ionisés.

§ 3. — Action de la permutite sur les filtrats de Moog et de Cristol.

Nous avons déterminé l'action de la permutite sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL provenant d'un certain nombre de sérums humains normaux ou pathologiques (1).

Pour obtenir des résultats comparables à ceux de nos recherches précédentes, nous avons effectué ces déterminations dans des conditions identiques à celles adoptées dans notre expérimentation sur les solutions trichloracétiques et les solutions lutéophosphotungstiques (voir ci-dessus, § 2).

I. — Étude des filtrats de Moog.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, nous introduisons 10 cm³ du filtrat envisagé et les neutralisons exactement par addition de soude normale, puis d'acide chlorhydrique N/50. Nous étendons le liquide neutralisé jusqu'au trait avec de l'eau distillée, agitons, puis filtrons sur 5 g de permutite disposés, ici encore, dans un entonnoir filtrant d'*Iéna* n° 15 a G 1. Nous dosons enfin l'azote total de la solution permutée sur une prise de 5 cm³ (correspondant au dixième du volume de filtrat mis en expérience) et rapportons le résultat au litre de sérum.

La différence entre la valeur trouvée et l'azote total trichloracétique avant permutation — préalablement déterminé — représente, également rapportée au litre de sérum, la perte d'azote du filtrat.

RÉSULTATS.

Nous avons réuni nos résultats dans le tableau XXI ; nous leur avons joint l'azotémie des sérums traités, témoin classique de leur état normal ou pathologique.

(1) Sérums de sangs veineux prélevés à jeun.

TABLEAU XXI

Diagnostic	Azotémie <i>en g. urée p. litre</i>	N total trichloracétique <i>en mg p. litre de sérum</i>		
		Avant permutation	Après permutation	Différence
Sujet normal	0,24	168	134	34
Sujet normal	0,30	226	190	36
Sujet normal	0,36	280	236	44
Icthiase biliaire	0,30	190	158	32
Hypertension	0,43	422	376	46
Cancer de la prostate	0,45	320	280	40
Emphysème pulmonaire	0,55	368	324	44
Adénome prostatique	1,40	748	676	72
Anurie	2,60	1508	1448	60
Cancer de l'estomac	2,95	1816	1686	130
Urémie convulsive	3,80	2004	1808	196
Néphrite chronique	3,88	2016	1840	176
Néphrite aiguë	3,90	1980	1798	182
Hépatonéphrite	4,20	2252	2084	168
Néphrite chronique	5,10	2488	2246	242

On voit que dans le cas des sérums normaux, la permutoxite retient seulement, comme nous l'avons déjà signalé (CRISTOL et FOURCADE [III]), 30 à 50 mg d'azote trichloracétique, et que cette fixation peut devenir bien supérieure dans le cas des sérums pathologiques.

II. — Étude des filtrats de Cristol.

MODE OPÉRATOIRE.

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, nous introduisons 25 cm³ du filtrat envisagé et poursuivons comme dans nos essais sur les filtrats de MOOG (voir p. 110).

La différence entre l'azote total de la solution permutée, rapporté au litre de sérum, et l'azote total lutéophosphotungstique avant permutation, représente, également rapportée au litre de sérum, la perte d'azote du filtrat.

RÉSULTATS.

Nos résultats et l'azotémie des sérums correspondants sont rassemblés dans le tableau XXII.

Les différences obtenues permettent de constater que l'action de la permutite sur les filtrats de CRISTOL est très inférieure à son action sur les filtrats de MOOG.

§ 4. — Teneur des filtrats de Moog et de Cristol en composés diaminés et part revenant à ces composés dans l'existence du double azote.

D'après les résultats de notre étude sur la permutation des composés azotés du sang (2^e partie, ch. III, § 2), on peut admettre que lorsqu'on permute un filtrat de MOOG, la différence :

N total trichloracétique avant permutation

— N total trichloracétique après permutation

représente sensiblement 60 p. 100 de l'azote total des acides diaminés et polypeptides d'acides diaminés existant dans ce filtrat ; on peut également admettre que dans le cas des filtrats de CRISTOL, la différence :

TABLeAU XXII

ion	Diagnostic	Azotémie <i>en g urée p. litre</i>	N total lutéophosphotungstique <i>en mg p. litre de sérum</i>		
			Avant permutation	Après permutation	Différence
	Sujet normal	0,24	142	116	26
	Sujet normal	0,30	192	168	24
	Sujet normal	0,36	238	210	28
	Lithiase biliaire	0,30	162	140	22
	Hypertension	0,43	374	346	28
	Cancer de la prostate	0,45	280	254	26
	Adénome prostatique	1,40	660	624	36
	Néphrite chronique	1,85	1090	1052	38
	Anurie	2,60	1422	1392	30
	Cancer de l'estomac	2,95	1662	1590	72
	Néphrite chronique	3,05	1646	1598	48
	Urémie convulsive	3,80	1754	1678	76
	Néphrite chronique	3,88	1758	1706	52
	Hépto-néphrite	4,20	2032	1958	74
	Néphrite chronique	5,10	2164	2082	82

N total lutéophosphotungstique avant permutation

— N total lutéophosphotungstique après permutation

représente environ 80 p. 100 de l'azote total des composés diaminés — acides diaminés et polypeptides à base d'acides diaminés — du sérum initial restés en solution.

Si l'on désigne respectivement par D_t et D_l la teneur en composés diaminés des filtrats de MOOG et celle des filtrats de CRISTOL, on a donc approximativement :

$$D_t = \frac{10}{6} (N \text{ total trichloracétique avant permutation}$$

— N total trichloracétique après permutation)

$$\text{et } D = \frac{10}{8} (N \text{ total phosphotungstique avant permutation}$$

— N total phosphotungstique après permutation),

D_t et D_l étant exprimées en milligrammes d'azote et rapportées au litre de sérum.

Appliquant ces relations aux différences des tableaux XXI (p. 111) et XXII (p. 113), nous avons établi la teneur en composés diaminés des filtrats correspondants, autrement dit, le taux de l'azote total diaminé trichloracétique (D_t) et de l'azote total diaminé lutéophosphotungstique (D_l) des sérums envisagés.

I. — Teneur en composés diaminés des filtrats de Moog.

Le calcul de l'azote total diaminé des filtrats de MOOG nous a donné les résultats suivants (tableau XXIII) :

TABLEAU XXIII

Observation	Diagnostic	N total diaminé trichloracétique en mg p. litre de sérum
I	Sujet normal	57
II	Sujet normal	60
III	Sujet normal	73,5
IV	Lithiase biliaire	53,5
V	Hypertension	77
VI	Cancer de la prostate	67
VII	Emphysème pulmonaire	73,5
VIII	Adénome prostatique	120
IX	Anurie	100
X	Cancer de l'estomac	217
XI	Urémie convulsive	327
XII	Néphrite chronique	293,5
XIII	Néphrite aiguë	303,5
XIV	Hépatonéphrite	280
XV	Néphrite chronique	403,5

On voit que les filtrats de MOOG sont relativement riches en composés diaminés, l'azote total diaminé trichloracétique représentant à lui seul 26 à 30 p. 100 de l'azote total trichloracétique dans le cas des sérums normaux, et cette proportion ne descendant qu'à 15 ou 20 p. 100 dans les cas d'hyperazotémie (cf. tableau XXI).

Les composés diaminés non protéidiques présents dans le sang subsistant à peu près intégralement dans les filtrats de MOOG (voir 2^e partie, ch. II), l'azote total diaminé trichloracétique se confond avec la teneur du sérum sanguin en ces composés.

L'action de la permutite sur les filtrats de Moog permet ainsi de définir un *indice de diaminémie*, indice de valeur normale comprise, exprimée en azote, entre 50 et 75 mg par litre ; il est intéressant de remarquer que la diaminémie peut considérablement s'élever à l'état pathologique, les acides diaminés et les polypeptides à base d'acides diaminés apparaissant surtout dans le sang dans les états s'accompagnant d'une intense protéidolyse (JEANBRAU et CRISTOL [112, 113]), et notamment, dans les néphrites chroniques urémigènes (observations XI, XII, XIV et XV).

II. — Teneur en composés diaminés des filtrats de Cristol.

Les teneurs en composés diaminés répondant aux pertes d'azote des filtrats de CRISTOL (tableau XXII) sont les suivantes (tableau XXIV) :

TABLEAU XXIV

Observation	Diagnostic	N total diaminé lutéophospho- tungstique en mg p. litre de sérum
I	Sujet normal	32,5
II	Sujet normal	30
III	Sujet normal	35
IV	Lithiase biliaire	27,5
V	Hypertension	35
VI	Cancer de la prostate	32,5
VIII	Adénome prostatique.....	45
XVI	Néphrite chronique	47,5
IX	Anurie	37,5
X	Cancer de l'estomac	90
XVII	Néphrite chronique	60
XI	Urémie convulsive	95
XII	Néphrite chronique	65
XIV	Hépatonéphrite	92,5
XV	Néphrite chronique	102,5

On constate qu'à l'état normal, la teneur en composés diamminés des filtrats de CRISTOL, rapportée au litre de sérum, reste inférieure à 40 mg N (correspondants à 16-18 p. 100 de l'azote total lutéophosphotungstique) et qu'elle dépasse rarement 100 mg (correspondants à 4-6 p. 100 de l'azote total lutéophosphotungstique) à l'état pathologique.

Notons que d'après nos recherches d'ordre qualitatif (2^e partie, ch. I et II), les composés diamminés présents dans les filtrats de CRISTOL seraient des acides diamminés libres, ou tout au moins, des polypeptides très peu condensés à base d'acides diamminés.

* * *

Connaissant l'azote total diamminé trichloracétique, D_t , et l'azote total diamminé lutéophosphotungstique, D_l , d'un sérum donné, on peut aisément en déduire dans quelle mesure l'existence de son double azote est due aux acides diamminés et aux polypeptides à base d'acides diamminés ; si N_t et N_l représentent respectivement l'azote total trichloracétique et l'azote total lutéophosphotungstique du sérum considéré, on a en effet :

P. 100 d'azote total diamminé du double azote =

$$\frac{N \text{ total diamminé du double azote}}{\text{Indice de polypeptidémie}} = \frac{D_t - D_l}{N_t - N_l}.$$

Dans le cas des sérums précédemment envisagés (voir tableaux XXIII, p. 115, et XXIV, p. 116), le calcul de ce pourcentage nous a conduit aux résultats suivants (tableau XXV) :

TABLEAU XXV

Observation	Diagnostic	Indice de polypeptidémie <i>en mg N p. litre de sérum</i>	N total diaminé du double azote <i>en mg p. litre de sérum</i>	P. 100 d'azote total diaminé du double azote
I	Sujet normal.	26	24,5	94
II	Sujet normal.	34	30	88
III	Sujet normal.	42	38,5	92
IV	Lithiase biliaire	28	26	93
V	Hypertension.	48	42	87,5
VI	Cancer de la prostate.	40	34,5	86
VIII	Adénome prostatique.	88	75	85
IX	Anurie.	86	62,5	73
X	Cancer de l'estomac.	154	127	82
XI	Urémie convulsive.	250	232	93
XII	Néphrite chronique.	258	228,5	88,5
XIV	Hépatonéphrite.	220	188,5	85,5
XV	Néphrite chronique.	324	301	93

On voit que plus des sept huitièmes de l'indice de polypeptidémie des sérums normaux et au moins sept dixièmes de celui des sérums pathologiques répondent à des composés diaminés ; autant qu'on puisse en juger par ces quelques résultats, les composés diaminés — acides diaminés et polypeptides d'acide diaminés — sont donc les constituants majeurs du double azote. Quant aux 5 à 30 p. 100 de double azote d'origine non diaminée, nos conclusions du chapitre précédent (voir pp. 97-98) permettent d'en attribuer l'existence aux polypeptides à base de cystine, à base de tryptophane, ou de haute condensation, et accessoirement, à la créatinine, à la cystine et au tryptophane.

CHAPITRE IV

AZOTE PEPTIDIQUE DES FILTRATS DE MOOG ET DE CRISTOL ET COMPOSITION DU DOUBLE AZOTE

Considérons un sérum sanguin quelconque et soient P_t et P_l son azote *peptidique trichloracétique* et son azote *peptidique lutéophosphotungstique*, c'est-à-dire, la teneur en azote peptidique de son filtrat de MOOG et celle de son filtrat de CRISTOL, rapportées au litre de sérum ; la différence : $P_t - P_l$ répond à l'*azote peptidique du double azote du sérum envisagé*.

Dans ce dernier chapitre, l'étude de la teneur en azote peptidique des filtrats de MOOG et de CRISTOL va nous permettre de préciser la teneur des sérums correspondants en azote peptidique du double azote, et par là, la part des polypeptides dans l'existence de l'indice de polypeptidémie.

§ 1. — Teneur des filtrats de Moog et de Cristol en azote peptidique.

Nous avons dosé l'azote peptidique des filtrats de MOOG et de CRISTOL provenant d'un certain nombre de sérums humains normaux ou pathologiques (1) ; nous avons procédé suivant la technique précédemment décrite (I^{re} partie, ch. II, § 2), technique sur laquelle nous ne reviendrons pas ici.

(1) Sérums de sangs veineux prélevés à jeun.

I. — Teneur en azote peptidique des filtrats de Moog.

Nos résultats et l'azotémie des sérums traités sont réunis dans le tableau XXVI qui reprend et complète nos chiffres antérieurement publiés (CRISTOL et FOURCADE [114]).

TABEAU XXVI

Observation	Diagnostic	Azotémie en g urée p. litre	N aminé trichloracétique en mg p. litre de sérum		N peptidique trichloracétique en mg p. litre de sérum
			Libre	Total	
XVIII	Sujet normal.	0,28	60,2	73,8	13,6
XIX	Sujet normal.	0,35	52,0	79,2	27,2
III	Sujet normal.	0,36	63,6	87,6	24,0
XX	Paralysie générale.	0,44	68,4	103,6	35,2
XXI	Cancer du foie.	0,52	89,2	125,0	35,8
XXII	Bronchite chronique.	0,60	59,2	88,2	29,0
VIII	Adénome prostatique.	1,40	73,2	115,0	41,8
XXIII	Anurie.	1,86	67,0	118,6	51,6
XXIV	Néphrite chronique.	2,55	78,6	128,4	49,8
XXV	Hépatonéphrite.	3,60	108,4	201,2	92,8
XII	Néphrite chronique.	3,88	92,6	194,4	101,8
XXVI	Coma urémique.	4,80	123,2	244,2	121,0

On voit que les filtrats de MOOG renferment toujours des polypeptides, en quantités relativement faibles à l'état normal, mais rapidement croissantes dans les hyperazotémies (observations XXV, XII et XXVI). Nos constatations du chapitre II (2^e partie) permettent de considérer ces polypeptides comme représentant, à 5 ou 10 pour 100 près, les polypeptides totaux du sérum sanguin.

Les valeurs trouvées pour les sérums XVIII, XIX et III assignent à la peptidémie normale, exprimée en azote peptidique, un taux de 10 à 30 mg par litre, taux du même ordre que ceux indiqués par HILLER et VAN SLYKE [41], BECHER et HERMANN [85] et MARTENS [55] ; les conclusions de BLAU [121] suivant lesquelles le sang humain normal serait dépourvu de polypeptides se trouvent ainsi une fois de plus infirmées.

Les filtrats de MOOG de sérum normaux étant abiurétiques, leur azote peptidique répond nécessairement à des polypeptides simples tels que les dipeptides, le glutathion, etc. ; dans bien des rétentions azotées, l'obtention de filtrats biurétiques (CRISTOL et PUECH [1]) témoigne, par contre, d'une libération de polypeptides plus complexes dans le sang.

II. — Teneur en azote peptidique des filtrats de Cristol.

Nous avons rapporté nos résultats et l'azotémie des sérums correspondants dans le tableau XXVII (p. 122).

On constate qu'à l'état normal l'azote peptidique lutéophosphotungstique reste inférieur à 20 mg par litre, et qu'il ne dépasse qu'exceptionnellement 30 mg par litre à l'état pathologique. Quelle que soit l'azotémie, la teneur des filtrats de CRISTOL en polypeptides reste donc des plus minimes.

D'après nos conclusions du chapitre II (2^e partie), on peut admettre que les polypeptides présents dans les filtrats de CRISTOL sont essentiellement des polypeptides peu condensés, exempts d'acides diamminés ou de cystine ; cette hypothèse se trouve d'ailleurs vérifiée par le fait que les filtrats de CRISTOL sont toujours abiurétiques.

TABLEAU XXVII

Observation	Diagnostic	Azotémie en g urée p. litre	N aminé lutéophospho- tungstique en mg p. litre de sérum		N peptidique lutéophos- photungstiq. en mg p. litre de sérum
			Libre	Total	
XXVIII	Sujet normal.	0,28	56,8	63,2	6,4
XIX	Sujet normal.	0,35	51,8	70,0	18,2
III	Sujet normal.	0,36	58,6	71,0	12,4
XX	Paralysie générale	0,44	62,8	83,6	20,8
XXI	Cancer du foie.	0,52	82,8	100,6	17,8
XXII	Bronchite chron.	0,60	56,4	73,2	16,8
VIII	Adénome prostat.	1,40	64,6	79,6	15,0
XXIV	Néphrite chron.	2,55	71,2	90,4	19,2
XXV	Hépto-néphrite.	3,60	81,4	104,8	23,4
XII	Néphrite chron.	3,88	66,4	93,2	26,8
XXVI	Coma urémique.	4,80	88,8	119,2	30,4

§ 2. — Importance des polypeptides dans la composition
du double azote.

Compte tenu de ce que l'azote peptidique ne constitue qu'une fraction de l'azote total des polypeptides (1), la comparaison de l'azote peptidique du double azote d'un sérum donné à son

(1) Excepté, toutefois, pour les cyclopeptides tels que la cyclo-glycyl-glycine.

indice de polypeptidémie permet immédiatement de préciser dans quelle mesure cet indice doit son existence aux polypeptides ; on a en effet :

P. 100 d'azote peptidique du double azote =

$$\frac{N \text{ peptidique du double azote}}{\text{Indice de polypeptidémie}} = \frac{P_t - P_1}{N_t - N_1}$$

Dans le cas des sérums des tableaux XXVI (p. 120) et XXVII (p. 122), nous avons ainsi obtenu les résultats suivants (tableau XXVIII) :

TABLEAU XXVIII

Diagnostic	N total trichloracé- tique <i>en mg. p. litre de sérum</i>	N total lutéophosph. tungstique <i>en mg. p. litre de sérum</i>	Indice de polypeptidé- mie <i>en mg p. litre de sérum</i>	N peptidique du double azote <i>en mg p. litre de sérum</i>	P. 100 d'azote peptidique du double azote
Sujet normal.	186	164	22	7,2	33
Sujet normal.	236	200	36	9,0	25
Sujet normal.	280	238	42	11,6	27,5
Paralysie générale.	412	358	54	14,4	27
Cancer du foie.	356	298	58	18,0	31
Bronchite chron.	328	288	40	12,2	30,5
Adénome prostat.	748	660	88	26,8	30,5
Néphrite chron.	1.560	1.458	102	30,6	30
Hépto-néphrite.	1.930	1.708	222	69,4	31,5
Néphrite chron.	2.016	1.758	258	75,0	29,5
Coma urémique.	2.396	2.094	302	90,6	30

On voit que le pourcentage d'azote peptidique du double azote reste compris entre 25 et 35 pour 100 et dépend peu de l'état du sérum expérimenté.

Le double azote consistant pour plus de 70 p. 100 en composés diaminés (voir 2^e partie, ch. III, § 4), la plus grande partie de son azote peptidique se rapporte à des polypeptides à base d'acides diaminés, donc riches en azote non peptidique ; aux 25 à 35 p. 100 d'azote peptidique du double azote correspondent donc des pourcentages d'azote total polypeptidique de beaucoup supérieurs (1).

Le double azote apparaît ainsi comme étant presque entièrement formé de polypeptides ; de ce fait, les composés diaminés prenant part à son existence sont surtout les polypeptides d'acides diaminés, ce qui s'accorde pleinement avec l'hypothèse précédemment émise (p. 96), suivant laquelle les acides diaminés seraient peu susceptibles de subsister à l'état libre dans le sérum sanguin.

En définitive, nos essais de permutation et nos recherches sur la teneur des filtrats de MOOG et de CRISTOL en azote peptidique permettent de conclure que le double azote est constitué :

1^o pour 70 à 95 p. 100, par des composés diaminés, dont une majorité de polypeptides ;

2^o pour les 5 à 30 p. 100 restant, essentiellement par des polypeptides à base de cystine, à base de tryptophane, ou hautement condensés.

*
* * *

(1) Pour fixer les idées, notons que l'azote peptidique représente seulement 60 p. 100 de l'azote total de la triglycyl-lysine, 40 p. 100 de celui de la diglycyl-histidine et à peine 20 p. 100 de celui de la glycyl-arginine.

Composition réelle du double azote et signification physiopathologique de l'indice de polypeptidémie.

CRISTOL [48, 116], et avec lui divers auteurs (PUECH et CRISTOL [12], PUECH [17], JEANBRAU et CRISTOL [112, 113], JULIEN [117], etc...), considérant simplement le double azote comme une « *indice de polypeptidémie* », en font avant tout un test de protéidolyse ; suivant les termes même de CRISTOL [116, page 91], « dans l'immense majorité des cas », l'élévation de l'indice de polypeptidémie telle qu'on l'observe, principalement, dans les néphrites chroniques urémigènes, « serait due à l'autolyse tissulaire, laquelle pourrait être causée, soit par la rétention de diastases protéidolytiques, soit par les troubles de la crase sanguine, conséquences de l'imperméabilité rénale ».

La connaissance de l'exacte composition du double azote permet de préciser davantage la signification physiopathologique de l'indice de polypeptidémie.

On sait que selon l'hypothèse très généralement admise de KOSSEL [118], hypothèse d'ailleurs confirmée par CAHN [119] et par BONOT [120], les micelles protéidiques seraient constituées par un noyau central de composition bien définie pour un protéide donné, noyau autour duquel se grouperaient des chaînes de polypeptides labiles et de composition sujette à variations ; les noyaux, véritables groupements prosthétiques des micelles, seraient essentiellement formés de bases hexoniques, notamment d'arginine, alors que les chaînes labiles se composeraient surtout d'acide mono-aminés.

L'élévation de l'indice de polypeptidémie — c'est-à-dire, pratiquement, l'enrichissement du sang en polypeptides d'acides diamminés (voir page 124) — est ainsi la marque, non de protéidolyses quelconques, mais, uniquement, de protéidolyses intenses, irréversibles, atteignant les micelles protéidiques jusqu'au noyau. En toute exactitude, le double azote doit donc être considéré comme un test de protéidolyse grave, ce qui s'accorde pleinement avec les constatations cliniques qui ont depuis longtemps établi le caractère rapidement fatal de son accroissement.

RÉSUMÉ

Dans la première partie de ce travail, après avoir rappelé en quoi consiste la méthode de dosage des polypeptides sériques de CRISTOL et les critiques dont elle a fait l'objet, nous avons précisé les conditions générales de notre étude en nous étendant principalement sur les méthodes de dosages utilisées, et les améliorations ou aménagements que nous leur avons apportés.

La deuxième partie de notre exposé a trait à nos recherches personnelles sur la composition du *double azote*, ou *indice de polypeptidémie*.

Ces recherches nous ont donné les résultats suivants :

1° Dans les conditions de la désalbumination de MOOG, et à l'exception de certaines albumoses, les composés azotés non protéidiques du sang en solution aqueuse échappent complètement à la précipitation trichloracétique.

2° Dans les conditions de la désalbumination de CRISTOL, l'acide lutéophosphotungstique ne précipite les solutions aqueuses d'ornithine, de lysine, d'arginine, d'histidine et de cystine qu'à partir de concentrations supérieures ou égales à 360 mg par litre (exprimées en azote) ; dans les mêmes conditions, les polypeptides à base d'acides diamminés ou de cystine et tous ceux de haute condensation sont presque entièrement précipités.

3° Les phénomènes d'adsorption accompagnant la désalbumination de MOOG n'ont qu'une influence négligeable sur le comportement des composés azotés non protéidiques du sang.

4^e Au cours de la désalbumination de CRISTOL, la créatinine, les acides diaminés, la cystine, le tryptophane et les polypeptides à base d'acides diaminés, de cystine, de tryptophane, ou hautement condensés, sont adsorbés ou précipités dans de fortes proportions ; les autres composés azotés non protéidiques du sang ne sont, par contre, retenus que pour moins de 10 pour cent.

5^e Parmi les composés azotés non protéidiques du sang, seuls la lysine, l'arginine, l'histidine, la cystine et les polypeptides correspondants sont, pratiquement, fixés par la permutite ; leurs pourcentages fixés sont voisins de 100 dans le cas de solutions aqueuses, de 60 dans le cas de solutions trichloracétiques analogues aux filtrats de MOOG, et de 80 dans le cas de solutions lutéophosphotungstiques analogues aux filtrats de CRISTOL.

6^e La permutation des filtrats de MOOG permet de définir un *indice de diaminémie* représentant, exprimée en azote, la teneur du sérum sanguin en acides diaminés et polypeptides à base d'acides diaminés. L'indice de diaminémie atteint 50 à 75 mg par litre à l'état normal et s'élève considérablement dans les états d'histolyse ; il est constamment supérieur à l'azote total diaminé lutéophosphotungstique.

7^e La teneur des filtrats de MOOG en azote peptidique, rapportée au litre de sérum, est normalement comprise entre 10 et 30 mg ; elle croît rapidement avec l'azotémie et dépasse de beaucoup celle des filtrats de CRISTOL correspondants.

8^e Le double azote est constitué pour plus de 70 p. 100 par des composés diaminés, dont une majorité de polypeptides ; ses autres constituants sont les polypeptides à base de cystine, à base de tryptophane, ou de haute condensation, et accessoirement, la créatinine, la cystine et le tryptophane.

9^e L'accroissement du double azote est la marque de protéidolyses intenses, désagrégeant complètement les micelles protéidiques, ce qui explique son caractère de particulière gravité.

APPENDICE

PRÉPARATION ET CARACTÈRES DU LUTÉOPHOSPHOTUNGSTATE DE SODIUM

Par union à l'anhydride tungstique, WO_3 , l'acide orthophosphorique engendre un certain nombre d'hétéropolyacides ; parmi ces composés, les seuls bien définis sont (MALAPRADE [121]) :

a) l'acide phosphoduodécitungstique :



b) l'acide lutéophosphotungstique :



Le lutéophosphotungstate de sodium ($\text{P}_2\text{O}_5, 18\text{WO}_3, 3 \text{ONa}_2 + q \text{H}_2\text{O}$) est le sel de sodium du second de ces acides ; on ne doit pas le confondre avec le phosphoduodécitungstate de sodium ($\text{P}_5\text{O}_{12}, 24\text{WO}_3, 3 \text{ONa}_2 + r \text{H}_2\text{O}$), sel de sodium de l'acide en 24 WO_3 .

(1) m étant égal à 42, 48, ou 59 selon le type de cristaux considéré (COPAUX [122], WU [123]).

(2) n étant égal à 18, 35 ou 37 selon le type de cristaux considéré (KEHRMANN [124], WU [123]).

Préparation du lutéophosphotungstate de sodium.

Nous avons précédemment spécifié (pp. 10, 15, etc.) que la désalbumination de CRISTOI, était basée sur l'emploi du lutéophosphotungstate de sodium ; devant la difficulté que nous avons parfois rencontrée pour nous procurer ce sel dans le commerce, nous avons été amené à le préparer au laboratoire.

D'après la technique habituelle (KEHRMANN [124]), le lutéophosphotungstate de sodium s'obtient à partir du tungstate de sodium et de l'acide orthophosphorique par l'intermédiaire du lutéophosphotungstate d'ammonium, puis de l'acide libre ; cette technique présente le double inconvénient d'être d'un faible rendement et de se prêter difficilement à la préparation d'un produit exempt d'ammoniaque. La technique ci-dessous, établie par CRISTOI, BÉNÉZECH et nous-même [125] à partir du phosphoduodécitungstate de sodium, produit commercial courant, permet d'éviter ces inconvénients.

Technique. — Verser, à chaud, 500 g de phosphoduodécitungstate de sodium dans 50 cm³ d'eau distillée, neutraliser le mélange par l'acide phosphorique (PO₄H₃ de $d = 1,71$), puis additionner d'un excès de 100 cm³ de cet acide.

Dans un ballon de deux litres muni d'un réfrigérant à reflux, porter le mélange à ébullition pendant huit heures en présence de quelques fragments de ponce ; le mélange prend une teinte vert-foncé due à la formation de dérivés d'oxydes inférieurs du tungstène ; on réoxyde par 5 à 6 cm³ d'eau bromée, on concentre la solution jaune obtenue jusqu'à consistance sirupeuse et on la verse dans un cristalliseur. Par refroidissement, le lutéophosphotungstate de sodium formé entre bientôt en voie de cristallisation et se rassemble en une couche jaune inférieure, se séparant ainsi de l'excès d'acide phosphorique et du phosphoduodécitungstate de sodium non transformé.

Décanter la couche supérieure, sensiblement incolore, et après complet refroidissement ; essorer la couche jaune à la trompe.

Dissoudre les cristaux essorés dans le minimum d'eau distillée, filtrer sur coton de verre, additionner le filtrat de quelques gouttes d'eau bromée et laisser évaporer à l'obscurité jusqu'à cristallisation avancée ; séparer alors les gros cristaux formés des eaux-mères — ce qui élimine les dernières impuretés — et les sécher soigneusement.

Avec cette technique, on obtient aisément, et avec un rendement supérieur à 70 p. 100, du lutéophosphotungstate de sodium bien cristallisé, exempt d'ammoniaque — condition qu'il importait, pour nous, de satisfaire — et à moins de 1 p. 100 de sel en 24 WO_3 .

Caractères du lutéophosphotungstate de sodium.

Le lutéophosphotungstate de sodium se présente normalement à l'état de cristaux jaune-citron possédant, d'après nos déterminations, 22 molécules d'eau de cristallisation ; il répond donc à la formule : $\text{P}_2\text{O}_5, 18 \text{ WO}_3, 3\text{Na}_2\text{O} + 22\text{H}_2\text{O}$. Ce sel cristallise dans le système rhomboédrique, ses faces p faisant un angle de $107^\circ 30' \pm 30' (1)$.

Le lutéophosphotungstate de sodium n'est pas efflorescent dans les conditions ordinaires et ne perd entièrement son eau de cristallisation que par un chauffage prolongé à $120^\circ\text{--}130^\circ$. Très soluble dans l'eau, ses solutions sont d'une coloration jaune-citron d'autant plus marquée qu'elles sont plus concentrées.

Lorsqu'on additionne une solution de lutéophosphotungstate de sodium de réactif de NESSLER, l'alcalinité du réactif provoque la décoloration de la solution et l'apparition d'un précipité blanc de tungstate ; la persistance d'une coloration jaune ou brune, accompagnée ou non d'un précipité brun, signifierait que la solution traitée renfermait de l'ammoniaque, témoin d'une préparation défectueuse du lutéophosphotungstate de sodium mis en œuvre.

(1) Nous remercions M. le Professeur P. CHATELAIN d'avoir bien voulu effectuer pour nous cette mesure.

BIBLIOGRAPHIE

- [6] ACHARD (C.), LÉVY (J.) et MARYNOWSKI (T.). — Sur l'azote non protéique du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 256-258.
- [85] BECHER (E.) et HERMANN (E.). — *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, 1931, **171**, 529-564 et 1932, **173**, 1-43.
- [70] BEET (A.G.) et FURZEY (D.G.). — *Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1936, **55**, 108 T. (D'après PALFRAY (L.) : La minéralisation dans la méthode de Kjeldhal. *Document. Scient.*, 1937, **6**, 305-308.).
- [115] BLAU (N.F.). — The amino-acid nitrogen of the blood. III : A study of the occurrence of peptide nitrogen in the blood. *J. biol. Chem.*, 1923, **56**, 867-879.
- [66] BOIVIN (A.). — Le microdosage du carbone par oxydation sulfochromique et le microdosage de l'azote par destruction sulfurique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 1269-1409.
- [120] BONOT (A.). — Contribution à l'étude de la constitution des protéides. *Thèse sciences, Paris*, 1934.
- [108] BUSSIT (J.). — Recherches analytiques sur l'arginine et l'histidine. *Actualités scientifiques et industrielles* (n° 272), Hermann et Cie, édit., Paris, 1935.
- [119] CAHN (T.). — Recherches de physiologie générale sur les variations des équilibres des constituants cellulaires au cours du développement embryonnaire et du jeûne. Constitution et évolution de la molécule des protides. *Thèse sciences, Paris*, 1928.

- [20] CAZALS (M.). — L'hyperpolypeptidémie post-opératoire. *Thèse médecine, Montpellier*, 1932.
- [122] COPAUX (H.). — *Ann. Chim.*, 1909, **17** (8^e), 217.
- [24] CRISTOL (P.). — Le dosage de l'azote total non protéique du sérum. Désalbumination trichloracétique ou métaphosphorique. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1922, **3**, 257-261.
- [25] CRISTOL (P.). — Le dosage de l'azote total non protéique du sérum. Étude comparée de la désalbumination trichloracétique et métaphosphorique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, **4**, 267-271.
- [26] CRISTOL (P.). — Études sur la désalbumination du plasma sanguin et des liquides albumineux. Note préliminaire. *Bull. Soc. Chim. France*, 1925, **37** (4^e), 1121.
- [27] CRISTOL (P.). — *Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs en vue du dosage de l'azote total non protéique et de son exploration en physiopathologie*. Maloine, édit., Paris, 1926.
- [28] CRISTOL (P.). — Conception chimique de la désalbumination acide. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 252-253.
- [21] CRISTOL (P.). — Nouvelles études sur la désalbumination du sang en vue du dosage de l'azote total non protéique et de la détermination de l'indice de polypeptidémie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 92-110.
- [48] CRISTOL (P.). — Sur l'existence et la signification de l'hyperpolypeptidémie chez les néphritiques. *Paris Médical*, 1933 **89**, 307-310.
- [116] CRISTOL (P.). — Les polypeptides du sang dans les néphrites. *Ann. de médecine*, 1935, **38**, 58-69.
- [31] CRISTOL (P.) et BOUKOVALA (A.). — Influence de la désalbumination sur le dosage de la créatinine dans les liquides albumineux. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1923, **4**, 344.
- [95] CRISTOL (P.) et FOURCADE (J.). — Précipitation des acides diamminés par l'acide phosphotungstique. *Bull. Soc. Chim. France*, 1938, **5** (5^e), 21.

- [110] CRISTOL (P.) et FOURCADE (J.). — Action de la permutite sur quelques acides aminés en solution aqueuse. *Bull. Soc. Chim. France*, 1938, **5** (5^e), 21.
- [111] CRISTOL (P.) et FOURCADE (J.). — Teneur du sérum sanguin en acides diaminés et en polypeptides d'acides diaminés. *Bull. Soc. Chim. France*, 1939, **6** (5^e), 608.
- [114] CRISTOL (P.) et FOURCADE (J.). — Teneur des filtrats de Moog et de Cristol en azote peptidique et composition du « double azote ». *Bull. Soc. Chim. France*, 1939, **6** (5^e), Section de Montpellier, 31 III 1939.
- [125] CRISTOL (P.), FOURCADE (J.) et BÉNÉZECH (C.). — Note sur la préparation du lutéophosphotungstate de sodium. *Bull. Soc. Chim. France*, 1938, **5** (5^e), 1270.
- [60] CRISTOL (P.) et MONNIER (P.). — Désalbumination trichloracétique et azote total non protéique. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1106.
- [61] CRISTOL (P.) et MONNIER (P.). — Sur la valeur de certaines méthodes colorimétriques de dosage de l'azote polypeptidique du sérum : « l'index-tyrosine ». *Bull. Soc. Chim. France*, 1937, **4** (5^e), 808.
- [32] CRISTOL (P.) et NIKOLITCH (S.). — Influence de la désalbumination sur les résultats du dosage de l'azote non protéique du sang. Plasma et globules. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 469-486.
- [33] CRISTOL (P.) et NIKOLITCH (S.). — Effets de la concentration des désalbuminants acides sur les protides du sang. Cas de l'acide trichloracétique. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1924, **5**, 45-50.
- [30] CRISTOL (P.) et PORTES (F.). — Indoxylémie et réactifs désalbuminants. Les filtrats trichloracétiques colorés. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1923, **4**, 65-70.
- [1] CRISTOL (P.) et PUECH (A.). — Peut-on mettre en évidence la présence des polypeptides dans le sang ? *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 48-52.

- [34] CRISTOL (P.) et PUECH (A.). — Influence de la cholestérolémie sur la labilité des protéines. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 91-95.
- [19] CRISTOL (P.) et PUECH (A.). — Études sur la polypeptidémie chez les cancéreux et de ses modifications au cours des traitements curiethérapiques et radiothérapiques. *Le Languedoc Médical*, 1930, **13**, 434-441.
- [29] CRISTOL (P.) et SIMONNET (M.). — A propos du dosage de l'azote total non protéique du sérum. Du choix d'un dé-désalbuminant convenable. *J. Pharm. Chim.*, 1922, **26** (7^e), 298-309.
- [35] CRISTOL (P.) et TRIVAS (J.). — Le dosage des acides aminés par la méthode de Folin. Influence de la désalbumination acide. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 243.
- [106] DAVIES (W.C.). — The titration of protein hydrolysates. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 815.
- [67] DENIGÈS (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). — *Précis de Chimie analytique* (6^e édit.). Edit. médic. Maloine, Paris, 1931.
- [73] DUMAZERT (C.) et MARCELET (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation sulfurique (Méthode de Kjeldhal). *Bull. Soc. Chim. France*, 1937, **4** (5^e), 1373.
- [74] DUMAZERT (C.) et MARCELET (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 201-216.
- [47] FIESSINGER (N.), OLIVIER (H.R.) et HERBAIN (M.). — L'indice de désamination sanguine comme épreuve d'exploration fonctionnelle du foie. *Bull. Soc. Méd. Hôp. de Paris*, 1926, **50** (3^e), 1608-1616.
- [54] FOLIN (O.). — A system of blood analysis. Supplement III. *J. Biol. Chem.*, 1922, **51**, 377-391.
- [43] FOLIN (O.) et BERGLUND (H.). — The retention and distribution of amino-acid with especial reference to the urea formation. *J. biol. Chem.*, 1922, **51**, 395-418.

- [42] FOLIN (O.) et WU (H.). — A system of blood analysis. *J. biol. Chem.*, 1919, **38**, 81-100.
- [80] FOREMAN (F.W.). — *Biochem. J.*, 1920, **14**, 451.
- [8] GOIFFON (R.). — Le dosage des polypeptides en pratique médicale. *Le Journal médical français*, 1938, **27**, 9-16.
- [7] GOIFFON (R.) et SPAEY (J.). — Mesure de l'index tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 1675-1685.
- [51] GOIFFON (R.) et SPAEY (J.). — Méthode colorimétrique de mesure des polypeptides du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 711-713.
- [86] GORTNER (R.A.) et BLISH (M.J.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1915, **37**, 1630.
- [104] GORTNER (R.A.) et HOFFMANN (W.F.). — Evidence of a new amino-acid in proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1925, **47**, 580.
- [37] GRIGAUT (A.) et ZIZINE (P.). — A propos de la communication de CRISTOL et NIKOLITCH sur l'influence de la désalbumination sur les résultats du dosage de l'azote non protéique du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 379-380.
- [97] GULEWITSCH (W.). — Ueber das Arginin. *Z. physiol. Chem.*, 1899, **27**, 178.
- [38] HALLIBURTON (W.D.). — Goulstonian lectures on the chemical physiology of the animal cell. *Britisch med. Journ.*, 1893 (I), 627-632.
- [103] HANKE (M.T.) et KESSLER (K.K.). — Studies on proteinogenous amines. *J. biol. Chem.*, 1920, **43**, 527.
- [79] HARDING (V.J.) et MAC LEAN (R.M.). — A colorimetric method for the estimation of amino-acid α nitrogen. *J. biol. Chem.*, 1915, **20**, 217-230.
- [96] HAUSMANN (W.). — Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. *Z. physiol. Chem.*, 1899, **27**, 95.
- [18] HENRIET (P.). — L'azotémie post-opératoire. Revue générale. Étude statistique. *Thèse médecine, Montpellier*, 1929.

- [41] HILLER (A.) et VAN SLÛKE (D.D.). — A Study of certain protein precipitants. *J. biol. Chem.*, 1922, **53**, 253-267.
- [112] JEANBRAU (E.) et CRISTOL (P.). — La valeur pronostique de l'étude des divers composés azotés non protéiques du sang dans les maladies de l'appareil urinaire. 64^e Congrès des Sociétés savantes, Clermont-Ferrand, 7-11 avril 1931.
- [113] JEANBRAU (E.) et CRISTOL (P.). — Influence de l'imperméabilité rénale sur les métabolismes endogènes chez les néphritiques. *L'insuffisance rénale, Congrès d'Evian*, 18-20 septembre 1933. Masson et Cie, édit., Paris, 1933.
- [117] JULIEN (L.). — L'auto-hémo-protidolyse chez l'homme normal et le néphrétique. Ses relations avec la pathogénie de l'intoxication urémique. *Thèse médecine, Montpellier*, 1935.
- [91] KAHANE (E.). — Une cause d'erreur dans le dosage de l'urée du sang. *Bull. Soc. Chim. France*, 1927, **41** (4^e), 110-113.
- [124] KEHRMANN (F.). — *Z. anorg. Chem.*, 1892, **1**, 423-441.
- [107] KERNOT (J.C.) et KNAGGS (J.). — The estimation of the diammononitrogen in the products of hydrolysis of proteins. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 528.
- [22] KJELDHAL (Z.). — *Z. anal. Chem.*, 1883, **22**, 366.
- [118] KOSSEL (A.). Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie. *Ber. d. Deuts. chem. Gesellsch.*, 1901, **34**, 3214-3246.
- [99] KUTSCHER (F.). — Ueber die Verwendung der Phosphorwolframsäure bei quantitativen Bestimmungen der Spaltangspprodukte des Eiweiss. *Z. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 215.
- [46] LAUDAT (M.). — Méthode d'analyse permettant d'établir la « formule azotée » du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 137-148.
- [69] LAURO (M.F.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, édit. 1931 (n° 3), 401. (D'après PÉNAU H. et GAUDUCHON J. — Contribution à l'étude chimique du bilan d'azote. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, **15**, 1483-1497).
- [49] LÉVY (J.) et PACU (M.M.). — L'ultrafiltration du sérum et du plasina. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 707.

- [9] LOISELEUR (J.). — Sur la mise en évidence d'une forme masquée de l'azote, spécifique des états d'histolyse. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 1059-1081.
- [121] MALAPRADE (L.). — Acides phosphotungstiques et phosphotungstates. *Traité de Chimie minérale, direction P. PASCAL* (XI, 167-168). Masson et Cie, édit., Paris, 1932.
- [10] MARTENS (R.). — Considérations sur le dosage séparé des acides aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 454-482.
- [53] MARTENS (R.). — Contribution à l'étude de l'azote peptidique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 1336-1371.
- [89] MARTENS (R.). — Contribution à l'étude de la fonction protéopexique du foie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 1212-1246.
- [90] MARTENS (R.). — Rôle de la paroi intestinale et du foie lors de la résorption des produits de digestion des protéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 1187-1198.
- [55] MARTENS (R.). — Les principaux facteurs de la régulation de l'aminoacidémie et de la peptidémie. Etude physiopathologique. *Arch. int. de Méd. expérim.*, 1933, **8**, 361-482.
- [11] MARTENS (R.). — Le Double Azote. De la nature des éléments qui le composent. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1551-1568.
- [40] MARTIN (C.J.). — Does the non coagulable blood obtained by injections of Wooldrige's tissues fibrinogen (nucleo-albumins) contains peptone or albumoses? *J. Physiol.*, 1894, **15**, 375-379.
- [92] MEZINCESCO (M.D.). — Erreurs systématiques dans l'analyse du sang. I : Valeur des données analytiques obtenues après désalbumination par la méthode de Moog. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 109-112.
- [75] MILBAUER (J.). — Réactions en milieu d'acide sulfurique concentré. VII : Note sur les catalyseurs de kjeldhalisation. *Chem. Obzor.*, 1936, **2**, 208-211.
- [44] MINICH (J.). — Zur Bestimmung des Reststickstoff im Blute. *Biochem. Z.*, 1923, **142**, 266-273.

- [88] MITCHELL (H.H.) et HAMILTON (T.S.). — *The biochemistry of the amino-acids*. The Chemical catalog. company, édit., New-York, 1929.
- [52] MONDON (H.) et AUDIFFREN (M.). — Contribution à l'étude de la polypeptidémie. *Paris médical*, 1938, **28**, 185-189.
- [3] MOOG (R.). — Nouveau procédé de dosage, dans le sérum, de l'azote libérable par l'hypobromite de sodium. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 886.
- [93] MOOG (R.). — Sur le degré de précision de la méthode à l'acide trichloracétique pour le dosage de l'azote uréique dans le sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, **74**, 325.
- [81] NADEAU (G.F.) et BRANCHEN (L.E.). — Dosage des acides aminés en solution dans l'acide acétique cristallisable. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1935, **37**, 1363-1365.
- [62] NICLOUX (M.). — Sur le titrage final de l'ammoniaque dans la microméthode de Kjeldhal. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1171.
- [63] NICLOUX (M.). — Titrage final de l'ammoniaque dans le microdosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 483-488.
- [45] NIKOLITCH (S.). — Contribution à l'étude de l'uricémie. *Thèse médecine, Montpellier*, 1923.
- [100] OSBORNE (T.B.) et HARRIS (T.F.). — Nitrogen in protein bodies. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1903, **25**, 323.
- [50] PACU (M.M.). — Contribution à l'étude des éléments inorganiques du sang. *Thèse pharmacie, Paris*, 1932.
- [72] PARISELLE (H.). — Méthodes de destruction par divers agents minéralisants. *Traité de Chimie organique, Direction V. GRIGNARD* (I, 47-53). Masson et Cie, édit., Paris, 1935.
- [83] PARNAS (J.K.). — Existe-t-il des sels ammoniacaux dans le sang circulant ? *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 76-90.
- [84] PARNAS (J.K.) et HELLER (J.). — Ueber den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. *Biochem. Z.*, 1924, **152**, 1-28.

- [23] PARNAS (J.K.) et WAGNER (R.). — Ueber die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldhal. *Biochem. Z.*, 1921, **125**, 253-256.
- [105] PLIMMER (R.H.A.) et ROSEDALE (J.L.). — Analysis of protein by D.D. Van Slyke's method of determination of nitrogen distribution. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 1004.
- [82] POLONOVSKI (M.). — Sur le dosage des acides aminés et des polypeptides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 773-774.
- [65] POLONOVSKI (M.) et BOULANGER (P.). — Sur une modification du dispositif et de la technique de microdosage de l'ammoniaque dans les liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 944-959.
- [4] PREGI (F.). — *La micro-analyse organique quantitative* (traduit de l'anglais par G. WELTER). Les Presses Universitaires de France, édit., Paris, 1923.
- [14] PUECH (A.). — Influence de la radiothérapie sur la polypeptidémie. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 136-140.
- [15] PUECH (A.). — Hyperpolypeptidémie de résorption. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 187-190.
- [16] PUECH (A.). — Les hyperpolypeptidémies de choc. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 190-195.
- [17] PUECH (A.). — *Recherches sur la labilité des protéines du plasma et la polypeptidémie*. Roumégous et Déhan, édit., Montpellier, 1926.
- [12] PUECH (A.) et CRISTOL (P.). — Labilité des protéines du plasma et polypeptidémie dans les néphrites. *Bull. Soc. Sc. méd. Montpellier*, 1926, **7**, 104-117.
- [13] PUECH (A.) et CRISTOL (P.). — Du rôle des polypeptides dans l'intoxication urémique. Indice de polypeptidémie et néphrite urémigène. *Ann. de Médecine*, 1929, **25**, 43-69.
- [5] RAPPOPORT (F.). — *Mikrochemie des Blutes*. Vienne, 1935 (D'après MARTENS R. [11]).
- [58] RICHTER, QUITTNER et HENLINGER. — *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1921, **24**, 24.

- [87] ROXAS (M.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1916, **27**, 71.
- [71] SCHWÖGLER (E.J.), BABLER (B.J.) et HURD (L. C.). — Copper selenite as a catalyst in the Kjeldhal nitrogen determination. *J. biol. Chem.*, 1936, **113**, 749-751.
- [76] SÖRENSEN (S.P.L.). — Méthode de dosage des acides aminés. *Biochem. Z.*, 1907, **7**, 45.
- [68] SÖRENSEN (S.P.L.) et ANDERSEN (A.C.). — Löst sich der stickstoff-gehalt in Lysin und ähnlichen Verbindungen nach Kjeldhal bestimmen ? *Z. Physiol. Chem.*, 1905, **44**, 429-447.
- [36] STADIE (W.C.) et VAN SLYKE (D.D.). — The effect of acute yellow atrophy on metabolism and on the composition of the liver. *Arch. intern. Med.*, 1920, **25**, 693-704.
- [39] STARLING (E.H.). — Contribution to the physiology of lymph secretion. *J. Physiol.*, 1893, **14**, 130-153.
- [64] TASHIRO (S.). — Studies on alkaligenesis in tissues. I : Ammonia production in the nerve fiber during excitation. *Amer. J. Physiol.*, 1922, **60**, 519-543.
- [57] TERROINE (E.F.). — *Le métabolisme de l'azote*. Les Presses Universitaires de France, édit., Paris, 1936.
- [94] THOMAS (P.). — *Manuel de Biochimie*. Masson et Cie, édit., Paris, 1936.
- [77] VAN SLYKE (D.D.). — *J. biol. Chem.*, 1911, **9**, 185.
- [101] VAN SLYKE (D.D.). — The analysis of proteins by determination of the chemical groups characteristic of the different amino-acids. *J. biol. Chem.*, 1911, **10**, 15.
- [78] VAN SLYKE (D.D.). — The quantitative determination of aliphatic amino-groups. *J. biol. Chem.*, 1912, **12**, 275-284.
- [102] VAN SLYKE (D.D.). — Improvements in the method for analysis of proteins by determination of the chemical groups characteristic of the different amino-acids. *J. biol. Chem.*, 1915, **22**, 281-285.
- [98] WETZEL (G.). — Die organischen Substanzen des Schallen von *Mytilus* und *Pinna*. *Z. physiol. Chem.*, 1900, **29**, 386.

- [109] WHITEHORN (J.C.). — « Permutit » as reagent for amines. *J. biol. Chem.*, 1923, **56**, 751-764.
- [59] WILEWSKI (B.A.). — Sur l'ultrafiltration en vue de la déprotéinisation pour le dosage de l'azote aminé et de l'azote total non protéique dans le sang. *Biochem. Z.*, 1929, **204**, 433.
- [2] WOLFF (E.). — Sur l'albumosémie à l'état physiologique et pathologique. *Ann. de Médecine*, 1921, **10**, 185-197.
- [123] WU (H.). — Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances. *J. biol. Chem.*, 1920, **43**, 189-220.
- [56] ZUNZ (E.). — Die fractionierte Abscheidung der peptischen Verdannungsprodukte mittels Zinksulfat. *Z. physiol. Chem.*, 1899, **27**, 219-249.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

ASPECT DE LA QUESTION ET CONDITIONS GÉNÉRALES DE NOTRE ÉTUDE

CHAPITRE PREMIER. — La méthode de dosage des polypeptides sériques de Cristol	15
§ 1. Technique de la méthode	15
§ 2. Justifications de la méthode de CRISTOL	16
§ 3. Critiques adressées à la méthode de CRISTOL	22
CHAPITRE II. — Méthodes de dosage utilisées dans nos recherches.	29
§ 1. Dosage de l'azote total	29
§ 2. Dosage de l'azote peptidique	38
CHAPITRE III. — Expression des résultats par rapport au sérum dans les dosages comportant une désalbumination préalable	49
CHAPITRE IV. — Substitution d'une désalbumination trichlo- racétique au cinquième à la désalbumination de Moog dans le dosage du double azote	55

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA COMPOSITION
DU « DOUBLE AZOTE »

<i>Préliminaires</i>	61
CHAPITRE PREMIER. — Action de l'acide trichloracétique et de l'acide lutéophosphotungstique sur les composés azotés du sang en solution aqueuse	64
§ 1. Technique	65
§ 2. Résultats	68
§ 3. Interprétation des résultats du point de vue de la composition du double azote	80
CHAPITRE II. — Action de l'acide trichloracétique et de l'acide lutéophosphotungstique sur les composés azotés du sang en solution dans du sérum	83
§ 1. Technique	84
§ 2. Résultats	86
§ 3. Interprétation des résultats ; conséquences du point de vue de la composition du double azote	90
CHAPITRE III. — Action de la permutite sur les composés azotés du sang et sur les filtrats de Moog et de Cristol	99
§ 1. Permutite et permutations	99
§ 2. Action de la permutite sur les composés azotés du sang.	102
§ 3. Action de la permutite sur les filtrats de MOOG et de CRISTOL	110
§ 4. Teneur des filtrats de MOOG et de CRISTOL en com- posés diamminés et part revenant à ces composés dans l'existence du double azote	112

CHAPITRE IV. — Azote peptidique des filtrats de Moog et de Cristol et composition du double azote	119
§ 1. Teneur des filtrats de MOOG et de CRISTOL en azote peptidique	119
§ 2. Importance des polypeptides dans la composition du double azote	122
Résumé	127
Appendice	129
Bibliographie	133

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je reste fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Et ma qualité de Censeur de
tour, j'ai lu la Thèse ayant pour
titre :

*Recherches sur la composition du
" double azote ",*

par Jean FOURCADE.

Je pense que la Faculté peut en
permettre l'impression.

Montpellier, le 13 Juin 1939.

Le Professeur,
CRISTOL.

Vu :

Montpellier, le 26 Juin 1939

Le Doyen,
EUZIÈRE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 27 Juin 1939.

Le Recteur,
PARISELLE.

